

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

mr Sanja A. Dacić

**UTICAJ B VITAMINSKIH KOMPLEKSA
I RIBAVIRINA NA ODGOVOR
NERVNIH I GLIJSKIH ĆELIJA I
OPORAVAK MOTORNIH FUNKCIJA
NAKON POVREDE MOZGA PACOVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

MSc Sanja A. Dacić

**THE EFFECT OF VITAMIN B
COMPLEXES AND RIBAVIRIN ON
RESPONSE OF NEURONAL AND GLIAL
CELLS AND RECOVERY OF MOTOR
FUNCTION AFTER INJURY TO THE RAT
BRAIN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE:

Mentori:

dr Sanja Peković, naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu

dr Nadežda Nedeljković, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

dr Mirjana Stojiljković, redovni profesor i naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu

dr Irena Lavrnja, viši naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu

akademik prof Ljubisav Rakić, Srpska akademija nauka i umetnosti

Datum odbrane: _____ 2013. godine

ZAHVALNICA

Ovaj rad je urađen u Laboratoriji za neurohemiju, Odeljenja za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta „Ćelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju “ (projekat III 41014, rukovodilac prof dr Mirjana Stojiljković), u okviru podprojekta “Ispitivanje potencijalnih terapijskih pristupa u sanaciji neuroinflamacije i podsticanju regeneracije nakon oštećenja centralnog nervnog sistema” (rukovodilac dr Sanja Peković), koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Mentorima i članovima komisije zahvaljujem se za neizmerno strpljenje i pomoć koju su mi pružili u toku izrade i pisanja ovog rada.

Profesorki Mirjani Stojiljković zahvaljujem se za prethodne godine u kojima je jednom studentu pružila šansu da stigne do izrade magistarske pa doktorske teze.

Dr Sanji Peković, mom mentoru, veliko hvala za sugestije, tone pregledanih slika i upornost da se ova teza privede kraju.

Dr Nadeždi Nedeljković se zahvaljujem na kritičkom čitanju, savetima i komentarima koji su doprineli konačnom izgledu ove teze.

Dr Ireni Lavrnji veliko hvala za savete, pomoć i efikasnost koja mi nedostaje.

Zahvaljujem se profesoru Ljubisavu Rakiću što je omogućio da realizujemo naše ideje.

Posebno želim da se zahvalim kolegamicama Ireni, Deni, Danijeli, Ivani, Ani i Ivi za učešće i pomoć u toku svakodnevnog rada, ali nadasve za prijateljsku atmosferu u labu.

Veliko hvala Jasni, Danijeli, Biljani, Bajiću i ostalim kolegama sa fakulteta.

Slike u ovoj tezi imaju svoj konačan izgled zahvaljujući trudu mog supruga na čemu se posebno zahvaljujem.

Hvala mojoj porodici na razumevanju i podršci.

Tari i Senku za sve.

REZIME

Uticaj B vitaminskih kompleksa i ribavirina na odgovor nervnih i glijskih ćelija i oporavak motornih funkcija nakon povrede mozga pacova

Traumatska povreda mozga (TPM) predstavlja veliki zdravstveni problem savremenog društva jer je vodeći uzrok smrti i invaliditeta kod mlađih osoba. Uprkos znatnim istraživačkim i kliničkim naporima, još uvek ne postoji ni jedan dovoljno uspešan terapijski pristup koji utiče na sve patofiziološke procese koji prate moždanu traumu, odnosno, koji može ukloniti sve njene posledice. Stoga se uspešan tretman u borbi protiv TPM danas pokušava pronaći kombinacijom različitih terapijskih tretmana. Poznato je da je oporavak izgubljene funkcije nakon povrede mozga odraslih veoma spor i nepotpun usled nepovratnog uništenja nervnih ćelija i ograničene mogućnosti remodelovanja postojećih i formiranja novih neuronskih veza. Glavna prepreka za uspešniji oporavak posle oštećenja je nepermissivna sredina glijskog ožiljka koji se formira nakon povrede, a koji sprečava izrastanje novih nervnih vlakana i uspostavljanje novih neuronskih veza. Glijski ožiljak čine gusta mreža glijskih ćelija (astrociti i oligodendrocitnih prekursorskih ćelija) i nepropustan vanćelijski matriks (ECM). Cilj ove studije bio je da se ispita dejstvo kompleksa vitamina B (B1, B2, B3, B6 i B12) i ribavirina (RBV, purinskog nukleozidnog analoga) na oporavak motornih funkcija, posle jednostrane ablacije senzomotorne kore (ASK) prednjeg mozga pacova.

Mušjacima Wistar soja, starim 2.5 meseca, urađena je ASK prema sledećim koordinatama: 2mm ispred, 4 mm iza bregme i 4 mm lateralno od središnje linije u dubinu do pojave bele mase mozga. Operisane životinje podeljene su, prema tretmanu nakon ASK, u 6 grupa: L grupa - tretirana fiziološkim rastvorom; LK1 grupa - tretirana kombinacijom vitamina B1 (33 mg/kg/dan), B6 (33 mg/kg/dan) i B12 (0,5 µg/kg/dan); LK2 grupa - tretirana kombinacijom vitamina B2 (7,5 mg/kg/dan) i B3 (500 mg/kg/dan); LK grupa - tretirana kombinacijom svih pet vitamina: B1, B2, B3, B6 i B12 u prethodno navedenim dozama; LR grupa - primala je RBV (30 mg/kg/dan); LKR grupa - tretirana kombinacijom svih 5 B vitamina i RBV u prethodno navedenim dozama. Prva injekcija B vitamina data je i.p. 15 minuta nakon ASK, a potom na svaka 24 sata tokom sledećih 14 dana, dok je RBV aplikovan od 3 dana nakon ASK, jednom dnevno do kraja eksperimenta. Uticaj primenjenih tretmana na oporavak nakon ASK

praćen je testiranjem ponašanja (test prelaska preko grede - BW test), RT-PCR i Western blot analizom, kao i različitim imunohistohemijskim metodama.

Ispitivano je dejstvo različitih kombinacija B vitamina i RBV na oporavak koordinacije lokomocije nakon ASK. Pokazano je da primena B vitamina ubrzava oporavak lokomotornih funkcija, ali sa različitom efikasnošću: $LK \geq LK2 > LK1$, dok su kombinacije B vitamina i RBV imale sledeću efikasnost: $LK \geq LKR > LR$.

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je da se utvrdi efekat različitih kombinacija B vitamina i RBV na odgovor nervnih ćelija i na sinaptičku plastičnost. Procesi plastičnosti praćeni su primenom specifičnih markera izrastanja aksona, dendrita i formiranja sinapsi (GAP43, MAP2, sinaptofizin). Kompleks svih 5 B vitamina (LK), a naročito njegova kombinacija sa RBV (LKR) imaju najizraženiji efekat. Njihova primena podstakla je izrastanja aksona i dendrita, grananje dendrita kao i formiranje novih sinapsi. To je verovatno doprinelo stvaranju novih neuronskih veza čime se može objasniti zapaženi brži oporavak motorike zadnjeg kontralateralnog ekstremiteta. S druge strane, B vitamini (pre svega kombinacija B2+B3), njihove kombinacija sa RBV (LKR), kao i sam RBV (LR), pokazali su izrazito povoljan efekat u očuvanju neurona, što se ogledalo kako u njihovoj morfologiji (imunohistohemijsko bojenje sa antitelom na NF-H i SMI31), tako i u smanjenju broja degenerisanih neurona (Fluoro-Jade B obeležavanje, koje boji samo degenerisane neurone).

Posebno je ispitivan uticaj kompleksa B vitamina i RBV na proces reaktivne glioze i formiranje glijskog ožiljka u regionu oko mesta povrede. Pokazano je da tretmani ovim supstancama smanjuju broj reaktivnih astrocita i oligodendrocitnih prekursorskih ćelija i odlažu formiranja ožiljnog tkiva koje se intenzivno formira između 7. i 14. dana posle ASK. Kao specifični markeri reaktivnih astrocita korišćeni su GFAP, vimentin i S100B. U 14. danu posle operacije, pored povećanja broja reaktivnih astrocita, uočeno je značajno povećanje ekspresije GFAP i vimentina u svim operisanim grupama, kako na genskom, tako i na proteinskom nivou. Tretman različitim kombinacijama B vitamina (a najviše LK), kao i RBV smanjio je broj reaktivnih astrocita. Ekspresija S100B proteina takođe je značajno smanjena pod dejstvom kompleksa B vitamina i RBV i to sa sledećom efikasnošću $LKR \gg LR > LK$. Sva tri tretmana dovode do značajnog smanjenja broja reaktivnih astrocita i menjaju njihovu morfologiju ka mirujućoj formi astrocita.

Takođe, praćen je i odgovor komponenti ECM nakon povrede mozga. Primenom antitela na hondroitin sulfatne proteoglikane - CSPG (4S i 6S CSPG, fosfakan, neurokan i brevikan), koji su elementi ECM, uočeno je značajno povećanje njihove ekspresije u širokom pojasu oko mesta lezije. Dvojnim imunofluorescentnim bojenjem sa GFAP-om povećana ekspresija ovih CSPG uočava se oko reaktivnih astrocita, koji ih i izlučuju. Tretman kombinacijom svih pet B vitamina nakon ASK redukuje ekspresiju fosfakana, neurokana i brevikana na usku zonu oko mesta povrede, što doprinosi povećanju permisivnosti moždanog parenhima i omogućava izrastanje aksona i formiranje novih sinaptičkih veza, kao i uspostavljanju izgubljenih funkcija.

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske teze pokazuju da primena ispitivanih supstanci, iako one deluju posredstvom različitih mehanizama, poboljšava oporavak nakon ASK. To ukazuje da bi kombinacija vitamina B (B1, B2, B3, B6 i B12) i RBV mogla da bude efikasna dopuna postojećih pristupa terapiji povrede mozga, što zahteva dalju kliničku proveru.

Ključne reči: pacov, povreda mozga, koordinacija lokomocije, reaktivna astroglia, glijski ožiljak, izrastanje i grananje neurona, sinaptička plastičnost, hondroitin sulfatni proteoglikani, B vitamini, ribavirin

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Neurobiologija

UDK BROJ: [[591.481.1:599.323.4]:616.001.3]: [577.113+577.164.1]

ABSTRACT

The effect of vitamin B complexes and ribavirin on response of neuronal and glial cells and recovery of motor function after injury to the rat brain

Traumatic brain injury (TBI) is a major health problem in modern society, being a leading cause of death and disability among young people. Despite huge basic research and clinical efforts an effective treatment for TBI has not been established yet, that will counteract all of pathophysiological processes accompanying brain trauma. Therefore, a best possible present treatment that would act on several secondary processes in TBI is based on a combination of different therapeutic approaches.

A recovery of lost functions after brain injury is slow and incomplete in adults, due to the irreversible destruction of nerve cells and the limited ability of brain tissue for remodeling of existing and formation of new synaptic connections. The main obstacle for a successful recovery is existence of non-permissive glial scar, which emerges after a brain trauma preventing axonal sprouting and the establishment of new neural circuits. Glial scar consists of a dense network of glial cells (astrocytes and oligodendrocyte precursor cells) and dense extracellular matrix (ECM). The aim of this study was to explore the effects of vitamin B complex (B1, B2, B3, B6 and B12) and ribavirin (RBV, a purine nucleoside analogue) on the recovery of motor function after unilateral sensorimotor cortex ablation (SCA) of rat forebrain.

Two and a half-month old male Wistar rats underwent SCA at the following coordinates: 2 mm before, 4 mm behind the bregma and 4 mm lateral to the midline, and to the depth of the white matter. After the surgery, rats were randomly divided according to treatment protocol into 6 groups: group L - treated with saline solution; LC1 group - treated with a combination of vitamin B1 (33 mg/kg/day), B6 (33 mg/kg/day) and B12 (0,5 mg/kg/day); LC2 group - treated with a combination of vitamin B2 (7.5 mg/kg/day) and B3 (500 mg/kg/day), LC group - treated with a combination of all five vitamins: B1, B2, B3, B6 and B12 in the above mentioned doses, LR group - received RBV (30 mg/kg/day); LCR group - treated with a combination of 5 B vitamins and RBV in the above doses. The first injection of vitamin B was given i.p. 15 minutes after the SCA, and then daily during next 14 days, while RBV was first administered 3 days after the SCA, once daily until the end of the experimental protocol. The effects of treatment on the recovery after SCA were followed by

behavioral tests (beam walking test - BW test), while molecular changes were detected using RT-PCR, Western blot analysis and several immunohistochemical protocols.

We studied the effects of different combinations of B vitamins and RBV on recovery of locomotor coordination after SCA. It is shown that administration of B vitamins accelerates and improves coordination, with a treatment-specific efficacy: LC \geq LC2>LC1, while the combination of B vitamins and RBV have the following effectiveness: LC \geq LCR> LR.

One of the goals of this study was to determine the effect of application of different combinations of B vitamins and RBV on nerve cell responses and synaptic plasticity. Plasticity and remodeling were monitored using specific markers for axon and dendrites outgrowth and synapses formation (GAP43, MAP2, synaptophysin). The complex of all 5 B vitamins (LC), and particularly its combination with RBV (LCR) have the most pronounced effect. The LCR treatment induces sprouting of axons and dendrites, dendritic branching and the formation of new synapses, which probably contributes to the establishment of new neural connections, and observed rapid recovery of contralateral hind paw locomotor function. On the other hand, B vitamins (especially the combination B2 + B3), their combination with RBV (LCR) and RBV alone (LR) induced marked beneficial effects on nerve cells, as reflected both in their morphology (immunostaining with antibodies against NF-H and SMI31), and reduced number of degenerated neurons (Fluoro-Jade B labeling, stains only degenerated neurons).

Additionally, the effect of vitamin B complex and RBV was investigated on the process of reactive gliosis and glial scar formation in the region around the site of injury. It is shown that application of the substances reduces the number of reactive astrocytes and oligodendrocyte precursor cells and delays the formation of scar tissue that is being formed 7 to 14 days after the SCA. GFAP, vimentin and S100B were used as specific markers of reactive gliosis. At 14 days after the operation, in addition to the increased number of reactive astrocytes, a marked increase in GFAP and vimentin expression at both gene and protein level were observed in all experimental groups. Administration of B vitamins (particularly LC) and RBV reduces the number of reactive astrocytes and expression of S100B protein, with the following efficiency LCR>>LR>LC. All treatments led to a significant reduction in the number of reactive astrocytes and their transition to more resting-like morphology.

Furthermore, changes in the expression of ECM components after the injury were studied by using the antibodies specific for chondroitin sulfate proteoglycans - CSPG (CSPG 4S and 6S, phosphacan, neurocan and brevican), which are the main elements of the ECM. Significant increase in the expression in a wide area around the lesion was observed. Double immunofluorescence staining with GFAP revealed the up-regulation of CSPG around the reactive astrocytes, which are known to secrete them. The application of all B vitamins after SCA reduces the expression of phosphacan, neurocan and brevican to a narrow zone surrounding the injury site, thereby producing more permissive environment for neurite outgrowth and formation of new synaptic connections that may contribute to the observed restoration of brain functions.

The results obtained in this thesis show that the application of tested substances, even though they act via different mechanisms, improves recovery after SCA. This indicates that the cocktail of B (B1, B2, B3, B6, B12) vitamins in combination with RBV could be an effective contribution to the existing therapeutic approaches in the treatment of brain injuries, which certainly requires further clinical testing.

Key words: rat, brain injury, locomotor coordination, reactive astrogliosis, glial scar, neuronal sprouting and branching, synaptic plasticity, chondroitin sulfate proteoglycans, B vitamins, ribavirin

RESEARCH FIELD: Biology

RESEARCH AREA: Neurobiology

UDC NUMBER:[[591.481.1:599.323.4]:616.001.3]: [577.113+577.164.1]

SKRAĆENICE

acetil-CoA - acetil-koenzim A

ASK - ablacija senzomotorne kore

BW (Beam-walking test) - test prelaska preko grede

C-4-S - hondroitin-4-sulfat

C-6-S - hondroitin-6-sulfat

ChABC - hondroitinaza ABC

CNS - centralni nervni sistem

CNT (Concentrative Nucleoside Transporter) - koncentrativni nukleozidni transporteri

CS - hondroitin sulfat

CS-GAG - hondroitin-sulfatni glikozaminoglikani

CSPG - hondroitin sulfatni proteoglikani

EAE - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

ECM (Extracellular matrix) - vanćelijski matriks

ENT (Equilibrative Nucleoside Transporter) - uravnotežujući nukleozidni transporteri

FAD - flavin adenin dinukleotid

FJB (Fluoro-jade B) - Fluoro-Žad B

FMN - flavin mononukleotid

G6F - glukozo-6-fosfat

GABA - γ -amino buterna kiselina

GAD - glutamat-dekarboksilaza

GAP-43 (Growth-Associated Protein 43) - Protein rasta 43

GF - glikogen fosforilaza

GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) - glijski fibrilarni kiseli protein

GMP - guanozin monofosfat

GTP - guanozin trifosfat

IF - intermedijarni filamenti

IHC (immunohistochemistry) - imunohistohemija
IMP - inozin monofosfat
IMPDH - inozin monofosfat dehidrogenaza
i.p. - intraperitonealno
KGDH - dehidrogenaza α -ketoglutarata
KMB - krvno-moždana barijera
MAG - mijelin-asocirani glikoprotein
MAI (myelin-associated inhibitors) - inhibitori povezani sa mijelinom
MAP (Microtubule Associated Protein) - proteini vezani za mikrotubule
MeCbl - metilkobalamin
NF - neurofilamenti
NGF - faktor rasta nervnih ćelija
OPC - oligodendrocitne prekursorske ćelije
PARP - poli-ADP-ribozil polimeraza
PCR (polymerase chain reaction) - lančana reakcija polimerizacije
PDH - dehidrogenaza pirogroždane kiseline
PG - proteoglikani
PKC - protein kinaza C
PNM - perineuronalna mreža
PNS - periferni nervni sistem
RBV - ribavirin
RMP - ribavirin 5'-monofosfat
RNK - ribonukleinska kiselina
RPTP β (*receptor-type protein-tyrosine phosphatase β*)
RTP - ribavirin 5'-trifosfat
ST - sobna temperatura
TDF - tiamin difosfat
TGF- β (transforming growth factor) factor transformacije rasta- β
TK - transketolaza
TNF- α - faktor nekroze tumora- α

TPM - traumatska povreda mozga

TPP - tiamin pirofosfat

WB - Western blot

WKS - Wernicke-Korsakoff sindrom

XMP - ksantozin monofosfat

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Traumatska povreda mozga.....	3
1.2. Oporavak nervnog sistema nakon povrede.....	3
1.3. Odgovor CNS-a na povredu.....	7
1.3.1. Astrociti i njihov odgovor na TPM.....	9
1.3.2. Hondroitin-sulfatni proteoglikani.....	16
1.3.3. Citoskeletni proteini nervne ćelije i TPM.....	20
1.3.4. Protein rasta 43 (GAP-43).....	22
1.3.5. Sinaptofizin.....	23
1.4. Primena B vitamina u terapiji TPM.....	24
1.4.1. Vitamini B grupe.....	24
1.5. Primena ribavirina u terapiji TPM.....	32
1.5.1. Ribavirin.....	32
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	35
3. MATERIJAL I METODE.....	38
3.1. Materijal.....	39
3.1.1. Eksperimentalne životinje.....	39
3.1.2. Reagensi i rastvori.....	40
3.1.3. Antitela.....	43
3.2. Metode.....	45
3.2.1. Ablacija senzomotorne kore (ASK) prednjeg mozga pacova.....	45
3.2.2. Eksperimentalne grupe i tretman životinja.....	46
3.2.3. Test prelaska preko grede.....	48
3.2.4. Izolacija tkiva.....	50
3.2.5. Histološke analize.....	51
3.2.6. Izolovanje tkiva i određivanje koncentracije ukupnih proteina.....	54
3.2.7. Elektroforeza proteina.....	54
3.2.8. Western blotting.....	55
3.2.9. Imunoblot analiza.....	56
3.2.10. Semikvantitativna analiza imunoblotova.....	56
3.2.11. RT-PCR.....	57
3.2.12. Statistička obrada podataka.....	61
4. REZULTATI.....	62
4.1. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na oporavak motorne funkcije nakon povrede prednjeg mozga pacova (test prelaska preko grede - BW test).....	63
4.1.1. Lokomotorna koordinacija kod kontrolnih grupa životinja.....	63
4.1.2. Uticaj ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova na lokomotornu koordinaciju.....	65
4.1.3. Uticaj različitih kombinacija B vitamina na oporavak lokomotorne koordinacije nakon ablacije senzomotorne kore.....	65

4.2. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na odgovor neurona nakon povrede mozga.....	71
4.2.1. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na izrastanje i grananje neurita nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova.....	71
4.2.2. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju markera sinaptogeneze.....	86
4.2.3. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na neurodegeneraciju.....	91
4.3. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na odgovor glijskih ćelija nakon povrede mozga.....	99
4.3.1. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju GFAP nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova.....	99
4.3.2. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju vimentina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova ...	108
4.3.3. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju S100B nakon nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova	115
4.3.4. Uticaj kombinacije B vitamina na ekspresiju NG2 nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova.....	118
4.4. Ekspresija komponenti vanćelijskog matriksa (ECM) nakon povrede senzomotorne kore.....	122
4.4.1. 4S i 6S Hondroitin sulfatni proteoglikani.....	122
4.4.2. Uticaj B vitamina na ekspresiju proteoglikana fosfakana nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova.....	125
4.4.3. Uticaj B vitamina na ekspresiju proteoglikana neurokana nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova.....	129
4.4.4. Uticaj B vitamina na ekspresiju proteoglikana brevikana nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova.....	134
5. DISKUSIJA.....	138
5.1. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na oporavak lokomotorne funkcije nakon povrede prednjeg mozga pacova.....	142
5.1.1. Motorna koordinacija kod kontrolnih grupa životinja.....	143
5.1.2. Uticaj ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova na lokomotornu koordinaciju.....	143
5.1.3. Efekat B vitamina na lokomotornu koordinaciju nakon ablacije senzomotorne kore.....	144
5.1.4. Efekat ribavirina i kombinovanog tretmana B vitamina i ribavirina na motornu koordinaciju nakon ablacije senzomotorne kore.....	147
5.2. Uticaj tretmana različitim kombinacijama B vitamina i ribavirina na odgovor neurona nakon povrede mozga.....	148
5.2.1. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na izrastanje i grananje neurita nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova.....	149
5.2.2. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju markera sinaptogeneze.....	157

5.3. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na odgovor glijskih ćelija nakon povrede mozga	159
5.4. Ekspresija komponenti vancelijskog matriksa (ECM) nakon povrede senzomotorne kore	165
6. ZAKLJUČCI.....	171
7. LITERATURA.....	175

1. UVOD

Najčešće korišćena rečenica u radovima o traumatskoj povredi mozga (TPM) jeste: TPM predstavlja veliki zdravstveni problem savremenog društva jer je vodeći uzrok smrti i invaliditeta kod mlađih osoba (Vink i Van Den Heuvel, 2004; Peković i sar., 2006; Werner i Engelhard, 2007) za čijim se efikasnim tretmanom još uvek traga. Do danas nije pronađena ni jedna specifična supstanca koja može uticati na sve patofiziološke procese koji prate moždanu traumu, ili koja može ukloniti sve njene posledice. Verovatno to nikada i neće biti moguće zbog kompleksnosti i velikog broja procesa koji prate povredu. Stoga TPM predstavlja jedno neiscrpno polje istraživanja. Otkriće još jednog delića slagalice koji bi upotpunio naša saznanja, razvijanje novih strategija usmerenih na smanjenje oštećenja nakon povreda centralnog nervnog sistema (CNS) predstavlja cilj rada mnogih laboratorija. Ova teza bi trebala da bude još jedan mali doprinos tome.

1.1. TRAUMATSKA POVREDA MOZGA

Podela TPM na primarnu i sekundarnu povredu predstavlja način da se razdvoje i klasifikuju procesi koji se dešavaju u CNS-u nakon povrede ovog tkiva. Oštećenje koje nastaje kao rezultat inicijalnog mehaničkog događaja predstavlja **primarnu povredu** i ona je nepovratna. Odmah nakon povrede, u primarnoj zoni umire određen broj neurona, ali broj neurona koji propada raste u narednim časovima, danima, pa čak i nedeljama. Objašnjenje leži u sekundarnoj degeneraciji neurona koja se javlja na mestu povrede. **Sekundarna povreda** nije uzrokovana mehaničkim oštećenjem, nastaje postepeno iz primarne povrede, širi se i uključuje niz biohemijskih i metaboličkih promena započetih mehaničkom povredom (Young, 1987; Faden 1993, Gennarelli i Graham, 2005), koje se javljaju ne samo u oštećenim neuronima, već i u intaktnom okolnom tkivu. Sekundarno izumiranje neurona u zonama koje nisu neposredno zahvaćene lezijom nakon TPM nastavlja se u narednim danima i doprinosi trajnim oštećenjima moždanog tkiva. Posledice sekundarne povrede mogu biti ishemija, moždani edemi, acidoza, hemoragija (Cervos-Navarro i Lafuente, 1991).

1.2. OPORAVAK NERVNOG SISTEMA NAKON POVREDE

Između primata i glodara postoji analogija u funkcionalnoj organizaciji kortikalnih i subkortikalnih struktura, pa je mozak pacova dobar model za izučavanje procesa u toku razvića i oporavka nakon povrede mozga. Dugo je vladalo mišljenje da su nastala oštećenja u mozgu odrasle jedinke nepovratna, jer se sa završetkom razvića, smanjuje kapacitet nervnog sistema za regeneraciju. Pokazano je, međutim, da mozak ima sposobnost adaptacije na povredu i izvestan stepen oporavka izgubljenih funkcija, zahvaljujući plastičnosti nervnih ćelija (Kolb, 1999; Nudo, 2003; Fawcett, 2009; Castellanos i sar., 2010; Kolb i Teskey, 2012).

Procesi koji se odigravaju posle povrede mozga su plastičnost, oporavak i očuvanje funkcija. Plastičnost ili reorganizacija nervnog sistema predstavlja sve promene nervnog sistema izvan perioda normalnog razvića (Gispen, 1993). Neuronalna plastičnost opisuje dva fenomena: sinaptičku i anatomsku plastičnost. Sinaptička podrazumeva promene aktivnosti postojećih sinapsi, dok je anatomska plastičnost adaptivna reorganizacija neuritskih puteva koja pomaže oporavak nakon povrede CNS.

Oporavak podrazumeva povratak određenog ponašanja koje je bilo izgubljeno nakon povrede. Često oštećenje nekog regiona dovodi do posledične funkcionalne redukcije i gubitka neke sposobnosti za koju je bio zadužen povređeni deo moždanog tkiva. U mnogim studijama uočeno je da neki drugi regioni mozga mogu da preuzmu funkcije oštećenih (Xerri, 1998; Chu i sar., 2000; Frost i sar., 2003). Najčešće, funkcije koje su pripadale oštećenom tkivu preuzimaju regioni neposredno oko povrede, ali kada je povreda velikih dimenzija, može doći do redistribucije funkcija na širem području očuvanog moždanog tkiva, pa čak i u kontralateralnoj hemisferi.

U adultnom CNS-u regeneracija aksona je slaba, budući da oni retko uspeju da dođu do ciljne ćelije i uspostave funkcionalne sinapse. Nasuprot događajima u CNS-u, aksoni u perifernom nervnom sistemu (PNS) se bolje regenerišu i funkcionalno oporavljaju (Bray i sar., 1981). Distalni deo aksona odsečen od tela ćelije propada u toku aktivnog procesa koji dovodi do fragmentacije i raspadanja aksona (Valerova degeneracija). Ostaci bivaju uklonjeni radom glijskih ćelija i makrofaga. Proksimalni deo oštećenog aksona se izdužuje duž lanca Švanovih ćelija i uspostavlja nove sinaptičke kontakte sa ciljnom ćelijom. Švanove ćelije svojom bazalnom laminom, izgrađenom od multifunkcionalnih glikoproteina i proteoglikana, usmeravaju rastući konus aksona ka deaferentisanoj ciljnoj ćeliji. Na membrani Švanovih ćelija nađeni su receptori za NGF (faktor rasta nervnih ćelija) kojih nema na astrocitima (Assouline i Pantazis, 1989).

Na suprot tome, u CNS-u oštećeni aksoni sposobni su samo za ograničeno grananje, ali ne dolazi do njihovog izduživanja i regeneracija je neuspješna. Razlika u regenerativnom potencijalu PNS-a i CNS-a nastaje zbog **prisutnosti različitih tipova glijskih ćelija u ova dva sistema**. PNS je bogat Švanovim ćelijama na čijoj membrani su receptori za NGF (Assouline i Pantazis, 1989) i pokazano je da aksoni oba sistema efektivnije rastu u takvoj sredini (Richardson i sar., 1980, 1984; Benfey i Aguayo, 1982). CNS, međutim, sadrži oligodendrocite i astrocite, na čijoj membrani su inhibitorni makromolekuli koji onemogućuju rast aksona (Fawcett i sar., 1989 a,b; Bandtlow i sar., 1990).

Svaka povreda CNS-a izaziva niz reakcija kojima organizam odgovara na povredu. Jedan od odgovora na TPM je reaktivna glijoza koja dovodi do stvaranja glijskog ožiljka. Upravo zbog takvog okruženja regeneracija i remijelinizacija aksona u CNS su sporiji, a samim tim usporen je i funkcionalni oporavak.

Glijski ožiljak s jedne strane sprečava širenje lezije, ali sa druge strane predstavlja neprohodnu sredinu za izrastanje neurita i na taj način sprečava oporavak neuronske mreže. Glijske ćelije koje formiraju ožiljno tkivo proizvode **inhibitorne molekule** koji deluju na ćelije u okolini (Frederickson i Silver, 1991).

Identifikovan je veliki broj molekula u CNS koji ograničavaju regeneraciju. Klasifikuju se u dve velike grupe: inhibitori povezani sa mijelinom (myelin-associated inhibitors - MAI) (Zörner i Schwab, 2010) i hondroitin sulfatni proteoglikani (*engl-Chondroitin sulfate proteoglycan* - CSPG) (Asher i sar., 2001; Morgenstern i sar., 2002).

MAI su, kao što im ime kaže, komponente mijelina. Ovi proteini oligodendrocita narušavaju izrastanje neurita *in vitro* i ograničavaju rast aksona *in vivo* nakon oštećenja CNS. Grupi pripadaju Nogo-A (Chen i sar., 2000; GrandPre i sar., 2000), mijelin-asocirani glikoprotein (MAG) (McKerracher i sar., 1994), efrin-B3 (Benson i sar., 2005) i semaforin 4D (Sema4D) (Moreau-

Fauvarque i sar., 2003). Ovi molekuli, izuzev MAG, nisu pronađeni u PNS gde mijelin grade Švanove ćelije.

CSPG su glavni inhibitorni molekuli u glijskom ožiljku (Asher i sar., 2001; Morgenstern i sar., 2002), eksprimiraju ih reaktivni astrociti nakon povrede CNS. Mogu biti vezani za membranu ili oslobođeni u vanćelijski prostor. Članovi ove grupe inhibitora regeneracije su neurokan (Asher i sar., 2000), versikan (Schmalfeldt i sar., 2000), brevikan (Yamada i sar., 1997), fosfakan (Inatani i sar., 2001), agrekan i NG2 (Dou i Levine, 1994). U nekoliko studija ustanovljeno je da enzim hondroitinaza ABC redukuje inhibitorni efekat CSPG *in vitro* (McKeon i sar., 1995) i potpomaže rast aksona nakon povrede CNS (Barritt i sar., 2006; Massey i sar., 2006; Cafferty i sar., 2007).

Semaforin 3A takođe pripada inhibitornim molekulima (Kaneko i sar., 2006), ali ne pripada ni jednoj prethodno opisanoj grupi.

Oštećeni neuroni u CNS ne eksprimiraju ili nedovoljno eksprimiraju trofičke faktore rasta koji se javljaju u toku razvića i uspešne regeneracije perifernih neurona (Fu i Gordon, 1997). Zbog toga je njihova sposobnost regeneracije ograničena čak i u odsustvu inhibitornih molekula. Međutim, ako se poveća ekspresija ovih faktora u oštećenim neuronima CNS to pospešuje njihovu regeneraciju (Neumann i Woolf, 1999; Bomze i sar., 2001).

Oporavak se može podeliti na rani i kasni. Rani period oporavka nastupa neposredno posle lezije. Preostali, intaktni nervni završeci koji su bili u vezi sa oštećenim aksonima mogu postati nefunkcionalni. Javlja se hiperosetljivost. Uzrok ove pojave je povećan broj receptora na postsinaptičkoj membrani, pa denervisani deo ciljne ćelije postaje znatno osjetljiviji na preostale aferentne stimulse. U ranom periodu oporavka nakon lezije neaktivne sinapse postaju aktivne, a povećana je i efikasnost neoštećenih sinapsi (što je posledica povećane količine neurotransmitera u presinaptičkim, delimično oštećenim aksonima).

Kasni period oporavka karakteriše izrastanje novih ogranaka aksona (kolateralno grananje), koji se preusmeravaju ka drugoj sinapsi ukoliko je postsinaptička membrana oštećena.

1.3. ODGOVOR CNS-a NA POVREDU

Svako narušavanje integriteta moždanog tkiva započinje kaskadu ćelijskih i molekulskih događaja. Reakcija okolnog tkiva na povredu dovodi do formiranja barijere građene od glijskih ćelija (astrociti, mikroglija, oligodendrociti i oligodendrocitne prekursorske ćelije – OPC (Levine i sar., 1993; Levine, 1994; Hampton i sar., 2004). Ovo ograničavanje i izolovanje mesta povrede sprečava širenje sekundarne lezije i smanjuje daljnje oštećenje tkiva (Ridet i sar, 1997). Proces se naziva reaktivna glijoza i dovodi do formiranja glijskog ožiljka, strukture koja se menja i razvija u vremenu u zavisnosti od ćelija koje je grade.

Neposredno nakon lezije aktiviraju se makrofagi i mikroglija (Davalos i sar., 2005). Mikroglija je prisutna u mozgu u fiziološkim uslovima u mirujućoj formi sa dugim, tankim i razgranatim nastavcima. Nakon povrede ove ćelije se aktiviraju, dolazi do njihove deobe i migracije ka mestu povrede (Kreutzberg, 1996), te prelaska iz mirujuće forme u ćelije slične makrofagima. Na mestu povrede, 24 sata kasnije, nalazi se veliki broj aktiviranih ćelija mikroglije, a mogu biti prisutni i makrofagi poreklom iz krvotoka (ako je došlo do oštećenja krvno-moždane barijere, KMB) (Kreutzberg, 1996). Povećan broj mikroglija/makrofaga u različitim fazama aktivacije opstaje na mestu povrede mnogo nedelja (Fawcett i Asher, 1999). Aktivirana mikroglija ima mnoge osobine makrofaga i sposobna je da oslobađa slobodne radikale, azot oksid, derivate arahidonske kiseline i druge molekule. U *in vitro* modelu Zietlow i saradnici (1999) su pokazali da kontakt sa nervnim ćelijama menja ulogu mikroglije od neurotoksične u neuroprotektivnu, jer pod uticajem okolnog nervnog tkiva prestaju da oslobađaju čitav niz toksičnih molekula. Postoji nekoliko eksperimenata u kojima je ispitivan uticaj mikroglije na regeneraciju

aksona. Rabchevsky i Streit (1997) su implantirali mikrogliju na mesto povrede kičmene moždine, same ili u kombinaciji sa astrocitima. Pokazali su da je prisutna mikroglija stimulisala regeneraciju aksona CNS-a i da je učinila parenhim permisivnijim za rast neurita. U eksperimentima Moon i saradnika (2000) pokazano je da dolazi do snažne regeneracije aksona nigrostrijatnog trakta nakon lezije etidijum bromidom, koji smanjuje broj glijskih ćelija na mestu povrede, kao i da je glavni tip ćelija koje podržavaju rast aksona upravo mikroglija. U PNS-u jedna od faza procesa oporavka jeste invazija makrofaga u povređene nerve, a aksoni koji se regenerišu rastu kroz područje bogato makrofagama (Perry i Brown, 1992). Veliki, masivan odgovor mikroglije na povredu je odlika CNS-a nižih kičmenjaka kod kojih se dešava regeneracija aksona (Wilson i sar., 1992).

Međutim, pokazano je da mikroglija pored ove protektivne uloge, može da ima i štetnu, tako što oslobađa citotoksične medijatore, citokine, proteaze, kiseonične radikale (Giulian i Robertson, 1990; Merrill, 1992). Mnogi citokini deluju direktno na neurone koji poseduju brojne receptore za citokine. Citokini (IL-1) izazivaju oslobađanje drugih faktora rasta od strane astrocita (IL-6, NGF) koji potom utiču na aktivnost neurona (Cotman i sar., 1994). Citokini koje proizvode astrociti (Eng i Ghirnikar, 1994) i neuroni utiču na mikrogliju (Giulian i sar., 1994). Kao rani odgovor na povredu ćelije monocitne/makrofagne linije oslobađaju TGF- β (Logan i sar., 1992), a kasnije ga oslobađaju i ćelije mikroglije, astrociti i neuroni oko mesta povrede (McTigue i sar., 2000; Makwana i sar., 2007). TGF- β aktivira transkripciju gena koji kodiraju proteine jezgra mnogih hondroitin sulfatnih proteoglikana (CSPG) ili enzime koji regulišu sintezu glikozaminoglikana (GAG) (Asher i sar., 2000; Hamel i sar., 2005; Smith i Strunz, 2005; Gris i sar., 2007). Takođe, ovaj citokin povećava sulfataciju GAG i dovodi do povećanja količine CS-4 koje sintetišu astrociti (Susarla i sar., 2011). Pokazano je da astrociti oslobađaju TNF- α i inhibiraju preživljavanje OPC i sprečavaju njihovu diferencijaciju u zrele oligodendrocite, što dodatno onemogućava uspešnu remijelinizaciju nakon povrede CNS.

U narednim danima (3 do 5) posle povrede mobiliše se veliki broj NG2⁺ ćelija se iz okolnog tkiva. Ove ćelije (oligodendrocitne prekursorske ćelije – OPC i sinantociti) prvo povećavaju ekspresiju NG2 molekula na svojoj površini, a zatim se u velikom broju akumuliraju na mestu povrede verovatno kombinacijom proliferacije i migracije. Brojnost NG2 ćelija dostiže maksimum sedmog dana nakon povrede, zatim počinje da opada, ali ostaje povišena nekoliko nedelja (Levine, 1994; Keirstead i sar., 1998). Pokazano je da NG2, proteoglikan koji je nađen na membranama ovih ćelija, inhibira rast aksona senzornih, kortikalnih i cerebelarnih neurona (Dou i Levine, 1994; Fidler i sar., 1999; Chen i sar., 2002). Pored toga ove ćelije u manjoj meri u odnosu na astrocitate produkuju i fosfakan, neurokan, versikan koji mogu sprečiti izrastanje aksona (Schnaedelbach i sar., 1998). Činjenica da se NG2 u velikom broju okupljaju oko mesta povrede CNS-a, kao i da eksprimiraju veliki broj inhibitornih proteoglikana čini ih moćnim inhibitorima regeneracije aksona.

Zreli oligodendrociti inhibiraju konus rasta aksona preko Nogo i mijelin vezanog glikoproteina (MAG), ali ovakav efekat nije zabeležen kod nezrelih oligodendrocita. Finalnu strukturu ožiljnog tkiva predominantno čine astrociti koji se dele i polako migriraju na mesto povrede gde popunjavaju povredom upražnjen prostor (Fawcett i Asher, 1999).

1.3.1. Astrociti i njihov odgovor na TPM

1.3.1.1. Struktura i funkcije astrocita

U mozgu odraslog čoveka astrociti su najbrojniji tip glijskih ćelija i predstavljaju više od 50% ukupne ćelijske populacije kore velikog mozga (Bass i sar., 1971; Tower i Young, 1973). Njihova rasprostranjenost u svim regionima CNS-a i bliske veze koje uspostavljaju sa neuronima ukazuju na veliku raznovrsnost i svestranost ovih ćelija. Na osnovu razlika u morfologiji i anatomskoj lokalizaciji dele se u dva glavna podtipa: protoplazmatične i fibrozne astrocitate. Danas se zna da postoji veliki broj ćelija koje eksprimiraju različite molekule, kao što su GFAP, S100B ili glutamin sintetaza i postaju

reaktivne u odgovoru na različite povrede u regionima u kojima se nalaze u CNS-u, baš kao i protoplazmatični i fibrozni astrociti (Hewett, 2009). To su Milerove ćelije u retini, Bergmanova glija u malom mozgu, pituicite u neurohipofizi, tanicite i mnoge druge.

Fibrozni astrociti su dominantno prisutni u beloj masi, imaju malo telo sa svega nekoliko dugih, nerazgranatih nastavaka. U citoplazmi ovih astrocita prisutan je veliki broj fibrila i filamenata koji se prostiru i u nastavke. Pokazano je da su nastavci fibroznih astrocita u kontaktu sa Ranvijerovim suženjima (Butt i sar., 2004; Hamilton i sar., 2008). **Protoplazmatični astrociti** imaju krupnije telo sa kog polazi pet do deset glavnih nastavaka koji se potom dalje granaju i daju mrežu sve tanjih nastavaka preko kojih jedan astrocit uspostavlja kontakte i sa nekoliko stotina dendrita i obavlja 10 000 i više sinapsi (Bushong i sar., 2002; Ogata i Kosaka, 2002; Oberheim i sar., 2006; Halassa i sar., 2007a). Zastupljeni su u sivoj masi mozga. Pokazano je da se razgranati nastavci pojedinačnih astrocita (osim u distalnim delovima) ne preklapaju sa nastavcima drugih astrocita čime se formira mikrodomenska distribucija astrocita u kori (Halassa i sar., 2007) i hipokampusu (Bushong i sar., 2002; Ogata i Kosaka, 2002). Protoplazmatični astrociti, odnosno njihova završna stopala zajedno sa ćelijama endotela kapilara grade KMB (Risau i Wolburg, 1990; Araya i sar., 2008), koja održava odgovarajući jonski sastav vanćelijske sredine u moždanom tkivu (Walz, 1989; Simard i Nedergaard, 2004). Oba tipa astrocita na distalnim nastavcima grade pukotinaste veze sa susednim astrocitima (Peters i sar., 1991).

Uloge astrocita koje danas znamo daleko prevazilaze početne ideje ranih neuroanatora sa kraja 19. veka. Svakim danom se sve više potvrđuje višestruka i prisna prepletenost funkcija astrocita i neurona. Astrociti pružaju mehaničku potporu aksonima, učestvuju u vođenju aksona pri izrastanju i migraciji neurona tokom razvića, kao i u prostornoj organizaciji neurona u zreom mozgu (Hatten i Liem, 1981; Hatten i sar., 1991; Peters i sar., 1991). Sprečavaju moguću depolarizaciju okolnih neurona uspešno preuzimajući višak K^+ , koji se električnom aktivnošću neurona oslobađa u vanćelijski matriks (*engl.*

Extracellular matrix-ECM). Učestvuju u uspostavljanju jonske i transmitterske homeostaze u perineuronalnom tkivu (Simard i Nedergaard, 2004; Olsen i Sontheimer, 2008) i održavanju KMB (Risau i Wolburg, 1990). Regulišu protok krvi u mozgu koji zavisi od sinaptičke aktivnosti neurona (Schipke i Kettenmann, 2004; Magistretti, 2006). Astrociti prisutni oko sinapsi u CNS-u regulišu oslobađanje aktivnih molekula uključujući glutamat, purine (ATP i adenozin), GABA i D-serin i modulišu sinaptičku transmisiju što je dovelo do koncepta trodelne sinapse (Araque i sar., 1999; Nedergaard i sar., 2003; Halassa i sar., 2007b; Perea i sar., 2009). Učestvuju u produkciji molekula ECM (Ard i sar., 1993; Canning i sar., 1996; McKeon i sar., 1991; Massey i sar., 2006). Posle povrede astrociti su najbrojnije ćelije koje ograničavaju mesto povrede i štite okolno nepovređeno moždano tkivo (Fitch i sar., 1999; Silver i Miller, 2004; Pekny i Nilsson, 2005; Myer i sar., 2006).

1.3.1.2. Intermedijarni filamenti astrocita

Citoskelet eukariotske ćelije grade: mikrofilamenti ili aktinski filamenti (prečnika oko 6 nm); mikrotubule (oko 20 nm) i intermedijarni filamenti IF (8-12 nm). Najveća familija citoskeletnih proteina u sisarskim ćelijama je superfamilija IF. Održavajući oblik i plastičnost ćelije IF mreža deluje kao integrator u ćelijskom prostoru. IF se dele u 5 grupa (Fuchs i Weber, 1994). **Prvu i drugu grupu** čine kiseli i bazni keratini koji se javljaju u epidermalnim ćelijama. **Četvrtu** čine neurofilamenti (NF) koji se eksprimiraju u zrelim neuronima i čine glavnu citoskeletnu komponentu aksona. **Peta grupa** su lamini. **Treću grupu** čine intermedijarni elementi nediferenciranih ćelija, kao što su prethodnici neurona, glijskih ćelija i ćelija drugih tipova. U glijskim ćelijama ovoj grupi pripadaju vimentin, dezmin, glijski fibrilarni kiseli protein (**Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP**) i periferin.

Kao citoplazmatični markeri za identifikaciju astrocita koriste se intermedijarni filamenti (IF) tipa III i kalcijum vezujući protein S100B (Rajadhyaksha i Manghani, 2002).

Vimentin se eksprimira u ranom stadijumu ćelijske diferencijacije u nezrelim astrocitima (Correia i sar., 1999) i u radijalnoj gliji (Schachner i sar., 1977). Zna se da je ekspresija vimentina regulisana ćelijskim ciklusom, određenim faktorima rasta, serumom, tumorskim promotorima, viralnim infekcijama. Smatra se da vimentin ima ulogu u komunikaciji i transportu između ćelijske površine i jedra, tako što spaja jedro sa plazma membranom. Uloga vimentina je vrlo značajna u održavanju unutrašnje organizacije određenih ćelija jer drži organele i jedro na određenom mestu. Vimentin se koristi za identifikaciju velikog broja različitih tumora (Osborn i Weber, 1989) i nezrelih astrocita u procesu reaktivne astroglioze (Correia i sar., 1999).

U normalnom razviću mozga, ekspresija **GFAP** i nivo iRNK je daleko veći u beloj nego u sivoj masi (Lewis i Cowan, 1985). GFAP ima važnu ulogu u pokretljivosti astrocita, određuje njihov oblik i strukturnu stabilnost nastavaka. Postoje velika neslaganja oko uloge GFAP u kompleksnim ćelijskim događajima kao što su citoskeletna reorganizacija, ćelijska adhezija i signalni putevi. Smatra se da GFAP obezbeđuje mesta za vezivanje kinaza koje prepoznaju ključne ćelijske supstrate i tako omogućavaju GFAP-u da formira veze sa mikrofilamentima, integrinskim receptorima i ECM. Specifičan je marker zrelih astrocita u normalnim i patološkim uslovima.

U CNS-u viših kičmenjaka nakon povrede ili usled traume, bolesti, genetičkih poremećaja, astrociti postaju reaktivni i odgovaraju na tipičan način procesom astroglioze. Reaktivna astroglioza se karakteriše povećanjem ekspresije GFAP. Nivo ekspresije je značajno povećan od prvog dana pa sve do četvrte nedelje nakon traume (Lavrence, 2000; Peković i sar., 2005). Povećana količina GFAP-a je zapažena u eksperimentalnim modelima koji uključuju gliozu, kao što su kriogene lezije mozga (Kim i sar., 2012) i eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) (Lavrnja i sar., 2012).

Vimentinska vlakna nestaju nakon dvadesetog dana od rođenja (Pixley i de Vellis, 1984). U toku prve dve postnatalne nedelje, vimentin i nestin se postepeno zamenjuju GFAP-om čija količina raste od rođenja do dvadesetog

dana (Pixley i de Vellis, 1984). U mozgu adulta većina astrocita eksprimira samo GFAP (Pixley i de Vellis, 1984).

U toku ranog razvića CNS-a, IF ćelija radijalne glije i nezrelih astrocita sačinjeni su od vimentina (Franke i sar., 1978), a u danima oko rođenja njegovo mesto zauzima GFAP. U jednom kratkom periodu ova dva proteina koegzistiraju (Pixley i de Vellis, 1984), da bi nakon rođenja u diferenciranim astrocitima došlo do nestanka vimentina i drastičnog povećanja ekspresije GFAP, koji postaje glavni IF zrelih astrocita adulta (Bignami i sar., 1972; Lewis i sar., 1984). Kod adulta vimentin i GFAP prisutni su zajedno samo u specijalizovanim glijskim ćelijama - u tanicitama (de Vitry i sar., 1981), u Bergmanovim ćelijama (Lazarides, 1982; Schiffer i sar., 1986), u Švanovim ćelijama (Yen i Fields, 1981), kao i u reaktivnim Milerovim ćelijama (Bignami, 1984).

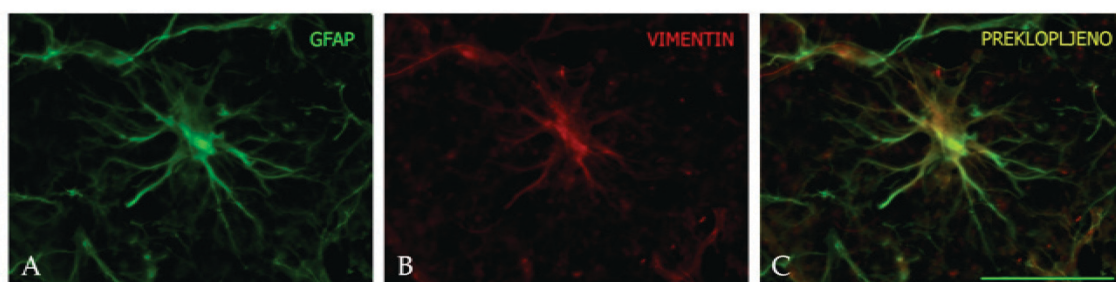
Ovakav odnos dva IF menja se u patološkim stanjima koja se karakterišu reaktivnom gliozom, složenim sledom biohemijskih i ćelijskih odgovora na razne vrste povreda CNS-a (Hatten i sar., 1991; Norton i sar., 1992; Eng i Ghirnikar, 1994).

1.3.1.3. Reaktivna astroglioza

Astrociti odgovaraju na TPM nizom događaja koji se nazivaju reaktivna astroglioza. Uočljiva je hipertrofija-povećanje ćelijskog tela i nastavaka (Nathaniel, 1981) i hiperplazija-povećanje broja astrocita (Latov i sar., 1979; Janeczko, 1993). Do povećanog broja ovih ćelija verovatno dolazi migracijom i proliferacijom. Na primer, pokazano je da zreli astrociti mogu ponovo ući u ćelijski ciklus i proliferisati (Bush i sar., 1999; Buffo i sar., 2008), mogu nastati i od NG2 progenitorskih ćelija iz okolnog parenhima (Magnus i sar., 2008) ili od multipotentnih progenitorskih ćelija koje migriraju na mesto povrede (Ohab i Carmichael, 2008).

Astrociti obnavljaju sposobnost ekspresije vimentina koju su izgubili u toku sazrevanja (Takamiya i sar., 1988) i povećavaju ekspresiju GFAP, koji

polimerizuje u brojne IF (Reier i sar., 1983; Miller i sar., 1986). Istovremeno povećanje ekspresije GFAP i vimentina (Slika 1.) javlja se samo u ćelijama koje se nalaze u blizini lezije (Takamiya i sar., 1988). U ovom regionu, 60% astrocита eksprimira zajedno oba IF dok su ostali pozitivni samo na GFAP (Calvo i sar., 1991).



Slika 1. Imunofluorescentno bojenje intermedijarnih filamenata GFAP proteina i vimentina u reaktivnim astrocitima nakon povrede kore prednjeg mozga pacova (iz teze). Skala 50 μ m.

Ovaj početni odgovor astrocита ima važnu ulogu u oporavku narušene KMB, smanjenju edema mozga i regulisanju protoka krvi (Bush i sar., 1999; Faulkner i sar., 2004). Postepeno reaktivni astrociti formiraju glijski ožiljak koji ograničava povređeno tkivo (Pekny i Nilsson, 2005), sprečava dalje širenje povrede, ali u kasnijem razdoblju može da ograničava rast neurita (McKeon i sar., 1991; Pekovic i sar., 2005).

U finalnoj formi, glijski ožiljak sadrži uglavnom mrežu građenu od čvrsto isprepletenih astrocitnih nastavaka povezanih tesnim i pukotinastim vezama.

Povećanje ekspresije GFAP smatra se markerom reaktivne glioze, ali povećanje može, a ne mora, da uključuje povećanu sintezu ovog proteina ili njegove iRNK. U nekim slučajevima, jedina promena je pojačana imunoreakcija koja može da se javi i bez povećanja količine ovog proteina, zbog promene u pristupačnosti epitopa koje prepoznaju anti-GFAP antitela (Norton i sar., 1992; Eng i Ghirnikar., 1994). Marker koji se često javlja u slučajevima aktivacije astrocита su protein S-100B, vimentin, različite komponente ECM, molekuli povezani sa imunskim odgovorom i molekuli iz porodice citokina/faktora rasta (Wu i Schwartz, 1998). Reaktivni astrociti sintetišu različite faktore rasta,

citokine i neuropeptide (Eddleston i Mucke., 1993; McMillian i sar., 1994), koji se ne detektuju kod astrocita u mirovanju.

Norton i saradnici (1992) pretpostavili su da različiti tipovi povreda indukuju drugačiji odgovor astrocita, specifičan po vremenskom toku, uključenosti kontralateralne strane, i po tome da li dolazi do povećanja nivoa iRNK za GFAP i/ili GFAP proteina. Razumevanje procesa aktivacije astrocita i specifičnosti zavisno od tipa povrede, mogu nam pomoći da pronađemo odgovarajući terapijski pristup kojim bi modulirali proces reaktivne astroglioze i tako doprineli oporavku.

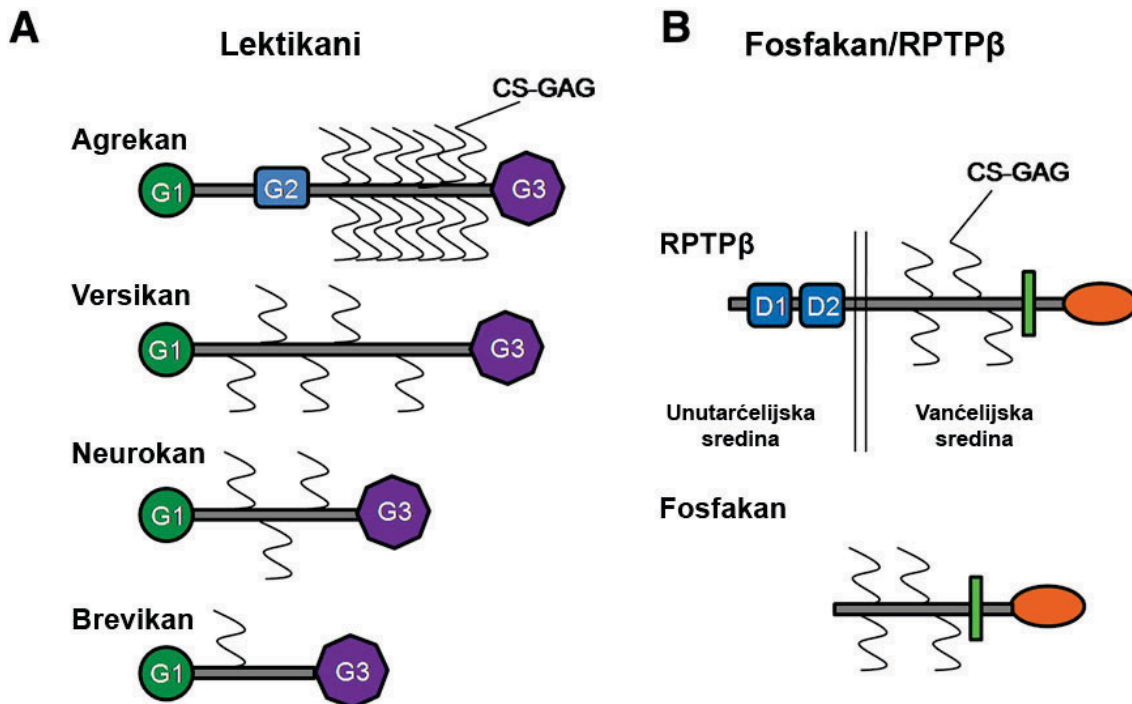
1.3.2. Hondroitin-sulfatni proteoglikani

Hondroitin-sulfatni proteoglikani su komponente ECM-a (Rouslahti, 1996) sa veoma raznovrsnim funkcijama. Uključeni su u regulaciju mnogih bioloških procesa, kao što su razviće mozga, neuronalnu plastičnost kod adulta i reorganizaciju mozga nakon povrede (Bovolenta i Fernaud-Espinoza, 2000; Asher i sar., 2001; Morgenstern i sar., 2002; Rauch, 1997, 2004).

Hondroitin sulfatni proteoglikani se sastoje od središnjeg proteina koji je kovalentno povezan sa dugim linearnim polisaharidnim lancima tj. hondroitin-sulfatnim glikozaminoglikanima (CS-GAG) (Rouslahti, 1988; Hartmann i Maurer, 2001). Broj bočnih lanaca, građenih od ponovljenih disaharidnih jedinica glukuronske kiseline i N-acetilgalaktozamina, varira od samo 1 do preko 100. Ovi šećerni ostaci mogu biti modifikovani sulfatacijom, a pozicija sulfatne grupe određuje tip CS (Properzi i sar., 2003). Disaharidne jedinice CS mogu biti monosulfatisane na poziciji 4 ili 6 N-acetilgalaktozamina (CS-A ili CS-C). Takođe, mogu biti i disulfatisani na poziciji 4 i 6 glukuronske kiseline i N-acetilgalaktozamina (CS-D) i na poziciji 4 i 6 N-acetilgalaktozamina (CS-E) (Sugahara i sar., 2003; Sugahara i Mikami, 2007). Zahvaljujući obilju negativno naelektrisanih sulfatnih grupa, sulfatacija GAG lanaca na odgovarajućim pozicijama određuje interakcije CSPG-a sa drugim molekulima (Wu i sar., 2005; Coles i sar., 2011). Interakcije CSPG-a sa drugim proteinima ECM-a posebno su važne u formiranju perineuronalne mreže (PNM) u koju su uklopljena tela i dendriti neurona (Celio i sar., 1998.).

CSPG proteini sadrže različite domene i grupisani su u četiri porodice na osnovu karakteristika proteinskih struktura. Najrasprostranjeniji CSPG u CNS su lektikani (pogledati revijski rad Yamaguchi, 2000), modularni proteoglikani-PG koji vežu hijaluronan i lektine. Oni se još nazivaju i hijalektani (Iozzo, 1998). Identifikovana su četiri predstavnika ove familije (Slika 2A.): agrekan (Doerge i sar., 1991), versikan (Zimmermann i Rouslahti, 1989), neurokan (Rauch i sar., 1992) i brevikan (Yamada i sar., 1994). Ovi proteini poseduju N-terminalni G1

domen, C-terminalni G3 domen i centralni region za koji se vezuju GAG lanci (agrekan ima i G2 domen) (Yamaguchi, 2000). G1 (homolog hijaluronan-vezujućeg proteina) vezuje hijaluronan. G3 sadrži tri različita strukturna dela koji mogu da vežu šećere, te otuda potiče ime ove familije lektikani (Rouslahti, 1996). Sledećoj, fosfakan/RPTP β familiji (Slika 2B.) pripada fosfakan koji nastaje alternativnom obradom transkripta za RPTP β (*eng. receptor-type protein-tyrosine phosphatase β*). RPTP β je kodirana jednim genom, a tri izoforme nastaju alternativnim isecanjem. Dve su membranske izoforme (RPTP β i short RPTP β) i jedna je sekretovana (fosfakan). Fosfakan je solubilan, predstavlja vanćelijski domen RPTP β , bez unutarćelijskih fosfataznih domena (Maurel i sar., 1994; Garwood i sar., 2003). Treća je porodica malih PG bogata leucinskim ostacima, koja uključuje dekorin i biglikan. Ovi proteini sadrže središnji deo bogat leucinskim ostacima i N-terminalna vezivna mesta za jedan (dekorin) ili dva (biglikan) CS-GAG lanca (Hocking i sar., 1998). U posebnu, četvrtu, grupu ubraja se NG2 koji je transmembranski CSPG sa velikim vanćelijskim domenom i sadrži do tri CS-GAG lanca (Stallcup, 2002) i neuroglikan-C (Oohira i sar., 2004).



Slika 2. Shematski prikaz strukture najčešćih CSPG u CNS-u (adaptirano iz Bartus i sar., 2012). A) Lektikani sadrže globularne domene G1 i G2 i središnji deo za koji se kovalentno vezuju CS-GAG lanci. B) Fosfakan/RPTPβ familija; RPTPβ ima dva unutarćelijska tirozin fosfatizna domena D1 i D2 kojih nema kod fosfakana.

CSPG učestvuju u brojnim ćelijskim procesima tokom razvića, uključujući ćelijsku adheziju, ćelijsku migraciju, izduživanje i vođenje neurita i sinaptogenezu (Kato-Semba i sar., 1995, 1998; Bandtlow i Zimmermann, 2000; Oohira i sar., 2000). U toku sazrevanja CNS menja se nivo ekspresije središnjeg proteina CSPG, kao i obrazac sulfatacije CS-GAG lanaca (Nandini i Sugahara, 2006). Nedavno je pokazano da dve vrste CS-GAG sa različitim sulfatisanim motivima, hondroitin-4-sulfat (C-4-S ili CS-A) i hondroitin-6-sulfat (C-6-S ili CS-C) ostvaruju različiti uticaj na izrastanje aksona. C-4-S GAG ispoljava snažan negativan uticajna razvoj neurona *in vitro*, što nije slučaj sa C-6-S (Wang i sar., 2008).

Nakon završetka kritičnog perioda, što je kod pacova prvi mesec po rođenju, CSPG se organizuju u PNM (Pizzorusso i sar., 2002) i učestvuju u regulaciji jačine sinaptičkih veza u odraslom CNS-u (Dityatev i sar., 2010). U

mozgu adultnih pacova CSPG imaju važnu ulogu u stabilizaciji sinaptičkih veza i ograničavanju neuroplastičnosti (Frischknecht i sar., 2009).

Nakon povrede CNS, glijske ćelije i inhibitorni molekuli formiraju i fizičku i hemijsku barijeru anatomskom i funkcionalnom oporavku neurona. Povećana ekspresija CSPG pokazana je u brojnim modelima povrede CNS, kao što je lezija kore prednjeg mozga (Asher i sar., 2000, Dacić i sar., 2008), entorinalne kore (Haas i sar., 1999; Thon i sar., 2000), malog mozga (Levine, 1994), presecanje nigrostrijatnog puta (Moon i sar., 2002) i povrede kičmene moždine (Lemons i sar., 1999; Jones i sar., 2003a; Tang i sar., 2003; Iaci i sar., 2007). Takođe je uočeno da CSPG inhibiraju rast aksona *in vitro* (Asher i sar., 2001; Fidler i sar., 1999; Sandvig i sar., 2004). Stoga, degradacija ovih molekula ima višestruko pozitivne efekte u procesima regeneracije u *in vivo* modelima povrede CNS (Busch i Silver, 2007; Kwok i sar., 2008; Bradbury i Carter, 2011). Primena bakterijskog enzima hondroitinaze ABC (ChABC) smanjuje nepermisivno dejstvo CSPG-a na rast neurona u adultnom CNS, što je ukazalo da su zapravo CS-GAG lanci odgovorni za inhibitorni efekat CSPG-a (McKeon i sar., 1995; Fidler i sar., 1999).

1.3.3. Citoskeletni proteini nervne ćelije i TPM

Glavni citoskeletni proteini nervne ćelije su neurofilamenti, tubulin, različiti proteini vezani za mikrotubule (*eng. Microtubule Associated Protein, MAP*) npr. MAP2 i tau, te aktin i spektrin.

Kao rezultat moždane traume javljaju se oštećenja neurocitoskeletnih elemenata što je jedan od uzroka disfunkcije neurona. Citoskeletni proteini nervne ćelije stupaju u međusobnu interakciju, kao i u interakciju sa drugim organelama. Uključeni su u citoplazmatski i aksonski transport organela i makromolekula, održavanje integriteta nervne ćelije i oslobađanje neurotransmitera. Citoskelet je dinamična struktura, pa su promene i reorganizacije citoskeletnih proteina neophodne za normalno funkcionisanje, ali neodgovarajuća organizacija ili uništenje komponenti citoskeleta mogu dovesti do oštećenja unutarćelijskog transporta i degeneracije neurona.

1.3.3.1. Neurofilamenti

Neurofilamenti su jedini intermedijarni filamenti specifični za neurone. Obezbeđuju mehaničku čvrstoću i stabilnost ćelijama, kao i održavanje asimetričnog oblika neurona. Sastavljeni su od tri različite subjedinice koje su na osnovu svojih molekulskih težina označene NF-L (68 kDa), NF-M (145-160 kDa) i NF-H (160-200 kDa) (Sihag i sar., 2007). U ranim fazama razvića nervnog sistema, stem ćelije u CNS eksprimiraju nestin koji nestaje tokom razvića (Lendahl i sar., 1990). Takođe, vimentin je zastupljen u većini neurona CNS pre diferencijacije, može se naći i u nekim zrelim neuronima gde učestvuje u formiranju i ekstenziji neurita (Nixon i Shea, 1992; Perrin i sar., 2005). Međutim, nakon uspostavljanja sinaptičkih kontakata NF građeni od tripleta NF-L, NH-M i NF-H postaju glavni delovi IF mreže u neuronima. Poznat je još jedan IF tipa IV, α -internexin za koji se danas pretpostavlja da predstavlja četvrtu subjedinicu NF (Yuan i sar., 2006). Kod glodara NF su obavezno heteropolimeri, zahtevaju kopolimerizaciju NF-L sa bar jednom većom subjedinicom (Lee i sar., 1993; Cooper i Hausman, 2003). Dva teža NF proteina, naročito NF-H, su

izrazito fosforilisani u aksonu, a slabo u telu i dendritima (Cohen i sar., 1987; Gotow i sar, 1992; 1995). U skladu sa razlikom u nivou fosforilacije, uočavaju se i morfološke razlike u organizaciji NF. Mnogo su gušće raspoređeni u aksonu, a proređeni u telu ili dendritima. Pokazano je da je povećana fosforilacija odgovorna za međusobnu interakciju NF (Eyer i Laterrier, 1988), a da smanjena fosforilacija NF-H omogućava interakciju NF sa mikrotubulama i drugim citoplazmatskim strukturama (Hisanaga i Hirokawa, 1990). Novosintetisani NF transportuju se u akson u skoro nefosforilisanom stanju, a stepen fosforilacije raste tokom transporta duž aksona (Carden i sar., 1987; Nixon i sar., 1987). Broj NF i rastojanje između njih direktno određuje dijametar aksona (Hoffman i sar., 1984). Promene normalne strukture IF u neuronu ili aksonu mogu narušiti spori aksonalni transport (Collard i sar., 1995; de Waegh i sar., 1992), promeniti provodljivost aksona ili dovesti do degeneracije (Straube-West i sar., 1996).

U mnogim modelima TPM kod kojih je oštećena i siva masa, dolazi do gubitka NF proteina ili smanjenja imunoreakcije na ove proteine. Naime, imunohistohemijske studije su pokazale da dolazi do fragmentacije, vakuolizacije kao i gubitka fine dendritske arborizacije u piramidnim neuronima ipsilateralne kore već u prvim satima posle povrede (Posmantur i sar., 2000). Ove promene koje su zahvatile neurone oko mesta povrede mogu dovesti do rearanžmana neurofilamenata i u daljim, neoštećenim regionima dovodeći do funkcionalnih oštećenja u tim preživelim neuronima.

1.3.3.2. MAP proteini

Proteini asocirani za mikrotubule (*MAP*) vezuju se za tubulin. Potrebni su za funkcionisanje mikrotubula i za njihovu interakciju sa organelama, vezikulama, ali i drugim citoskeletnim elementima (Matus, 1988; Poulain i Sobel, 2010). Smatra se da MAP stabilizuje mikrotubule i omogućava međusobno povezivanje bočnih lanaca, kao i njihovo povezivanje sa drugim intermedijarnim filamentima. Na osnovu molekulske mase dele se na a) MAP velike molekulske mase (MAP1A-C, MAP2A, MAP2B), b) tau proteine, c)

MAP srednje molekulske mase (MAP3, MAP4) i d) molekulske motore (kinezin, dinein). Kod sisara je najzastupljeniji MAP2, koji se eksprimira u ćelijskom telu neurona i dendritima (Matus, 1988). Pronađeno je više izoformi koje nastaju alternativnom obradom (MAP2A, 2B, 2C i 2D). Ovi proteini regulišu polimerizaciju mikrotubula. Promene ekspresije MAP2 neophodne su za diferencijaciju, rast i plastičnost neurona (Wiche, 1989; Johnson i Jope, 1992). Smanjenje ekspresije ovog proteina vodi ka strukturnim i funkcionalnim promenama u neuronima i sprečava izrastanje neurita (Caceres i sar., 1992; González-Billault i sar., 2002), odnosno dovodi do dezorganizacije mikrotubula i smanjenja ćelijskih nastavaka (Sharma i sar., 1994).

Studije na miševima i pacovima ukazale su na veliki gubitak imunoreakcije na MAP2 u ipsilateralnoj kori i hipokampusu nakon TPM (Hicks i sar., 1995; Saatman i sar., 1998). Pokazano je da je u regionima sa manje MAP2 prisutna i degeneracija i smrt neurona, pa se MAP2 koristi za procenu oštećenja neurona i za praćenje procesa oporavka dendritskih nastavaka posle povrede CNS-a (Furutani i Kibayashi, 2012).

1.3.4. Protein rasta 43 (GAP-43)

Protein rasta 43 (*engl. Growth-Associated Protein 43, GAP-43*) je fosfoprotein bogato zastupljen u konusima rasta i presinaptičkim membranama (Gispen i sar, 1985; Dent i Meiri, 1998). Veoma je retko i slabo ekspimiran na dendritima (DiFiglia i sar., 1990). Ekspresija ovog proteina u neokorteksu i hipokampusu pacova najveća je u toku prve dve nedelje nakon rođenja i podudara se sa povećanim grananjem aksonskih završetaka i formiranjem novih sinapsi (Dani i sar., 1991; Holtmaat i sar., 1995;).

Na konusima rasta ekspimiran je tokom razvoja nervnog sistema i tokom regeneracije (Benowitz i Rattenberg, 1997; Dent i Meiri, 1998; Korshunova i sar., 2007). Brzim aksonskim transportom doprema se u neurite koji izrastaju, posebno u konuse rasta (Skene i Willard, 1981). Fosforilacija GAP-

43 protein kinazom C (PKC) povećava grananje neurona, a od stepena fosforilacije zavisi efekat proteina na izrastanje neurita (Aigner i Caroni, 1995).

Ekspresija ovog proteina na diferenciranim neuronima adultnog mozga je mala, osim na neuronima koji su uključeni u sinaptičko remodeliranje, kao i u delovima mozga koje odlikuje velika plastičnost, npr. asocijativne zone (čeonu kore) mozga čoveka (Neve i sar., 1988), hipokampus i olfaktorne zone mozga pacova (Oestricher i Grispen, 1986; Verhaagen i sar., 1989).

GAP-43 interaguje sa citoskeletom i signalnim molekulima, kao što su kalmodulin, aktin, G proteini (Coggins i Zwiers, 1991; Aarts i sar., 1999). Eksperimentima na GAP 43 nokaut (knockout) miševima pokazano je da ima fundamentalnu ulogu u procesima učenja i pamćenja (Rekart i sar., 2005) i da je fosforilacija GAP-43 sa PKC neophodna za učenje (Routtenberg i sar., 2000).

Pojačan nivo ekspresije GAP 43 i njegove iRNK detektovan je na neuronima u regeneraciji nakon povrede nervnog tkiva (Doster i sar., 1991; Linda i sar., 1992; Stroemer i sar., 1995; Li i sar., 1998; Carmichael i sar., 2005; Korshunova i sar., 2007). Utvrđena je korelacija između ekspresije GAP-43 i regenerativnog potencijala oštećenih motoneurona (Yuan i sar., 2009). Povećanje ekspresije ovog proteina u vezi je sa većim grananjem neurona, dok je pri smanjenoj ekspresiji GAP-43 primećena promena morfologije konusa rasta (Kapfhammer, 1997). Stoga se ekspresija GAP-43 rutinski koristi kao marker rasta neurita i plastičnosti neurona (Dijk i sar., 2007).

1.3.5. Sinaptofizin

Sinaptofizin je kalcijum vezujući glikoprotein. On je integralni protein membrana sinaptičkih vezikula prisutan u mnogim neuroendokrinim ćelijama i u svim neuronima (Wiedenmann i Franke, 1985; Navone i sar., 1986; Sudhof i sar., 1987). Uključen je u procese formiranja sinapsi i egzocitozu, tj. učestvuje u transportu sinaptičkih vezikula, njihovom ukotljavanju i spajanju sa sinaptičkom plazma membranom (Sudhof, 1995; Tarsa i Goda, 2002). Budući da je isključivo lokalizovan u vezikularnoj membrani koristi se kao molekularni

marker promena sinaptičke gustine u istraživanjima patofizioloških procesa koji se nalaze u osnovi neuroloških poremećaja (Masliah i Terry, 1993), kao i kod TPM (Shojo i Kibayashi, 2006; Hall i Lifshitz, 2010).

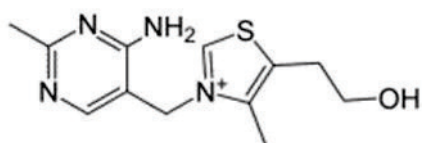
1.4. PRIMENA B VITAMINA U TERAPIJI TPM

Mnogo truda je uloženo u pronalaženje tretmana koji bi poboljšali funkcionalni ishod i smanjili štetu nakon povrede. Otkriveno je da mnoge prirodne supstance mogu biti veoma efikasne u poboljšanju ponašanja i smanjenju efekata sekundarne povrede nakon TPM. Imajući u vidu da prirodna jedinjenja generalno pokazuju manje ozbiljne nuspojave od drugih farmakoloških tretmana i imaju više neuroprotektivnih mehanizama delovanja, istraživanja njihove primene u oporavku nakon TPM sve više privlače pažnju istraživača. Među njima, u poslednje vreme, poseban akcenat je stavljen na ulogu B vitamina u regenerativnim procesima nakon povrede mozga (Hoane i sar., 2003, 2005; Kuypers i Hoane, 2010).

1.4.1. Vitamini B grupe

Vitamini B grupe su rastvorljivi u vodi i uglavnom funkcionišu kao koenzimi. Grupu čini 8 vitamina: B₁ (tiamin), B₂ (riboflavin), B₃ (niacin), B₅ (pantoteinska kiselina), B₆ (piridoksin), B₇ (biotin), B₉ (folna kiselina) i B₁₂ (kobalamin). U ovoj tezi ispitivali smo dejstvo 5 vitamina B grupe (B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂) (Slike 3.A-E) za koje je pokazano da imaju veliki potencijal u lečenju TPM.

1.4.1.1. Vitamin B1 (tiamin)



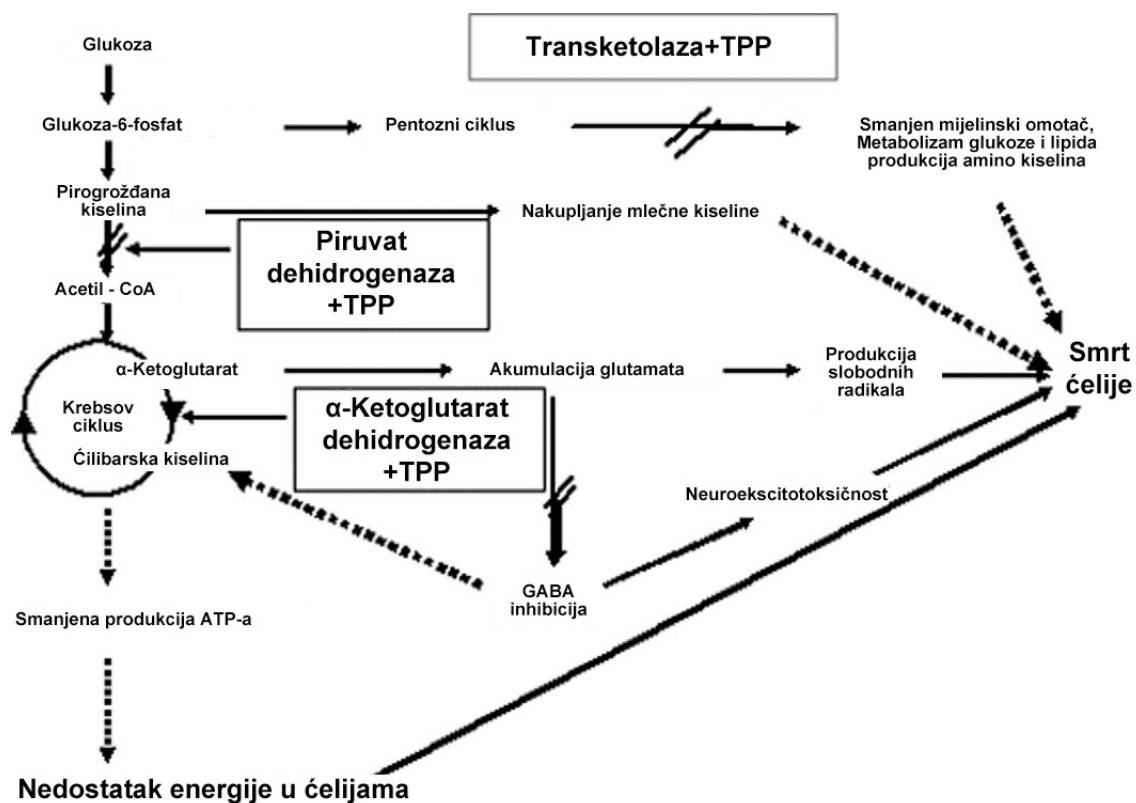
Slika 3A. Vitamin B1 (tiamin)

Nedovoljan unos B1 vitamina kod ljudi uzrokuje kardiovaskularne (beriberi) i neurološke poremećaje (Wernicke-

Vitamin B1, tiamin ili aneurin (Slika 3A.) je prvi identifikovani B vitamin. Bitan je za pravilno funkcionisanje svih organizama.

Nedovoljan unos B1 vitamina kod ljudi

Korsakoff sindrom, WKS). WKS karakterišu oštećenja nerava i problemi sa pamćenjem (nedostatak tiamina kod ovog sindroma povezan je sa hroničnim alkoholizmom). Visoke doze B1 mogu poboljšati koordinaciju mišića, ali retko poboljšavaju gubitak pamćenja. Bogati izvori tiamina su boranija, pivski kvasac i žitarice. B1 je uključen u katabolizam ugljenih hidrata (Itokawa, 1996), sintezu NADPH, ATP i formiranje nukleinskih kiselina. Tiamin difosfat-TDF (ranije je korišćen naziv tiamin pirofosfat-TPP) je aktivan oblik tiamina i funkcioniše kao specifični kofaktor za nekoliko enzima, uključujući dehidrogenazu pirogroždane kiseline (PDH), dehidrogenazu α -ketoglutarata (KGDH), transketolazu (TK) (Frank i sar., 2007). Ovi enzimi učestvuju u katabolizmu ugljenih hidrata i pokazuju smanjenu aktivnost pri nedostatku tiamina (Slika 3. A1) (Butterworth i sar., 1993; Pekovich i sar., 1998; Bubber i sar., 2004).



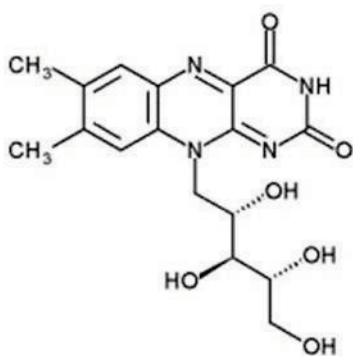
Slika 3A1. Enzimi zavisni od tiamina: transketolaza, piruvat dehidrogenaza i α -ketoglutarat dehidrogenaza, kao i njihova uloga u patogenezi i ćelijskoj smrti do kojih dovodi nedostatak tiamina. Preuzeto iz Fattal-Valevski, 2011.

PDH katalizuje dekarboksilaciju pirogroždane kiseline u acetil-koenzim A (acetil-CoA), koji ulazi u Krebsov ciklus. KGDH katalizuje dekarboksilaciju α -ketoglutarata u CoA ćilibarne kiseline. TK učestvuju u alternativnom putu oksidacije glukoze, u pentozo-fosfatnom putu.

Tiamin ima važnu ulogu u energetsom metabolizmu mozga. Nedostatak tiamina dovodi do patoloških promena u nervnom tkivu, kao što su atrofija mozga, krvarenje, oštećenja bele mase (Yamashita i Yamamoto, 1995; Langlais i Zhang, 1997), gliozna i značajan gubitak neurona (Witt, 1985; Mulholland, 2006). Za stvaranje energije mozak koristi glukozu koja difuzijom prolazi KMB (Rao i sar., 2006). Budući da oko 30% glukoze u mozgu biva u potpunosti oksidovano kroz Krebsov ciklus (Siebert i sar., 1986) prethodno navedena tri enzima čija aktivnost zavisi od tiamina su od vitalne važnosti za metabolizam glukoze u mozgu (Martin i sar., 2003). Oni koriste TDF kao kofaktor i preuzimaju oko 80% od ukupne količine tiamina u nervnom sistemu (Ishii i sar., 1979). Smanjenje aktivnosti PDH i KGDH doprinosi smanjenju sinteze ATP i vodi ka smrti ćelije (Aikawa i sar., 1984). Smanjenje nivoa pirogroždane kiseline koja ulazi u Krebsov ciklus povećava koncentraciju mlečne kiseline u mozgu i dovodi do acidoze (Hakim, 1984). Manja produkcija acetil-CoA uzrok je smanjene sinteze acetilholina (Heinrich i sar., 1973; Jankowska-Kulawy i sar., 2010). Gubitak aktivnosti KGDH odgovoran je za promene koncentracije nekih neurotransmitera uključujući γ -amino buternu kiselinu (GABA), glutamat i aspartat (Hazell i sar., 1993; Langlais i Zhang, 1993). TK učestvuje u pentoznom ciklusu u kom nastaje redukovani NADPH koji je dalje uključen u razne ćelijske reakcije npr. sintezu lipida i uklanjanje kiseoničnih radikala. TK su tako odgovorne za održavanje redoks stanja ćelije (Slekar i sar., 1996), pa nedostatak tiamina povećava oksidativni stres (Calingasan i sar., 1999). Produkt pentoznog puta je i fosforiboza koja dalje ulazi u procese sinteze nukleotida, nukleinskih kiselina, koenzima i polisaharida. Smanjenje tiamina dovodi do poremećaja sinteze ribonukleinskih kiselina - RNK (Boros i sar., 2003). Pored uloge koenzima u metaboličkim

procesima, tiamin ima i strukturnu ulogu (Haas, 1988; Ba[^], 2008). Neke studije su pokazale da je tiamin aktivna komponenta aksoleme, mitohondrijske (Tanaka i Cooper, 1968; Itokawa i sar., 1972) i sinaptozomske membrane (Matsuda i Cooper, 1981), da može da utiče na sinaptičku transmisiju i modifikuje aktivnost membranskih jonskih kanala (Tallaksen i Tauboll, 2000). Tokom embriogeneze tiamin stabilizuje membrane novonastalih nervnih ćelija i usporava pojavu apoptoze tokom razvića (Ba[^] i sar., 2005).

1.4.1.2. Vitamin B2 (riboflavin)



Slika 3B. Vitamin B2 (riboflavin)

reakcijama koje su glavni izvor energije za mnoge organizme, a takođe su bitni za metabolizam ugljenihhidrata, masti i sintezu aminokiselina (Rivlin, 1996).

Vitamin B2 (Slika 3B.) je strukturni deo koenzima flavin adenin dinukleotida (FAD) i flavin mononukleotida (FMN) (McCormick, 1994; McCormick i Greene, 1994; Merrill i sar., 1981). Ovaj koenzim učestvuje u oksido-redukcionim reakcijama koje su glavni izvor energije za mnoge organizme, a takođe su bitni za metabolizam ugljenihhidrata, masti i sintezu aminokiselina (Rivlin, 1996).

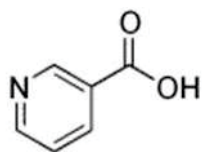
Pokazano je da primena B2 vitamina smanjuje otok nakon fokalne ishemije (Betz i sar, 1994) i da značajno poboljšava oporavak motornih funkcija u modelu kontrolisane kontuzione povrede čeone kore (Hoane i sar., 2005). Pretpostavljeni mehanizam delovanja ovog vitamina jeste preko uklanjanja slobodnih radikala i smanjenja oksidativnih oštećenja. Enzim NADPH-zavisna flavin reduktaza redukuje riboflavin u dihidroriboflavin koji brzo smanjuje nivo oksidovanog gvožđa, čime štiti ćelije od oksidativnog oštećenja. Veza između smanjenja oksidativnog oštećenja i oporavka funkcije nakon povrede je dobro poznata (Hoane i sar, 1997;. Fiskum, 2000). Dihidroriboflavin redukuje hemproteine koji sadrže gvožđe višeg oksidativnog stanja (kao što su Fe(IV)O i Fe(V)O), za koje je utvrđeno da je povezano s oksidativnim oštećenjem tkiva

(Hultquist i sar., 1993; Betz i sar, 1994). Ovi hemproteini doprinose oštećenju ćelija, a B2 štiti srce, pluća i mozak od ishemijskih povreda (Hultquist i sar., 1993; Betz i sar, 1994). Istraživanja iz 2004 godine (Ksendzova i sar. 2004) pokazala su da B2 stupa u vezu sa organskim radikalima i da može da zaštiti granularne ćelije malog mozga od ekscitotoksičnosti izazvane glutamatom (Lin i sar., 2004).

B2 se nalazi u pečurkama, kvascu i mesu (govedina, svinjetina, jagnjetina).

1.4.1.3. Vitamin B3 (niacin)

Termin nijacin odnosi se na nikotinamid (amid nikotinske kiseline), nikotinsku kiselinu (piridin-3-karboksilne kiseline) i derivate koji ispoljavaju biološku aktivnost nikotinamida.



Slika 3C. Vitamin B3 (niacin)

Vitamin B3 (Slika 3C.) u formi koenzima nikotinamid adenin dinukleotida (NAD) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADP), koji deluju kao akceptori ili donori

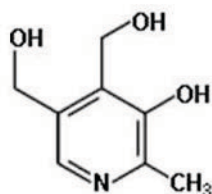
hidridnog jona, učestvuje u mnogim biološkim redoks reakcijama važnim u ćelijskom metabolizmu. NAD je koenzim brojnih enzima uključenih u ćelijsko disanje i oksidaciju energetski važnih molekula kao što su gliceraldehid 3-fosfat, mlečna kiselina, 3-hidroksibutirat, pirogroždana kiselina i α -ketoglutarat. NADP učestvuje u biosintezi masnih kiselina i steroida, oksidaciji glukoze-6-fosfata u ribozo-5-fosfat u pentoznom putu.

Neki enzimi seku N-glikozidnu vezu u NAD i katalizuju prenos ADP-riboze na proteine: mono-ADP-riboziltransferaza (Hassa i sar., 2006) i poli-ADP-ribozil polimeraza (PARP) (Virág i Szabó, 2002; Hassa i sar, 2006). PARP učestvuje u replikaciji i popravci DNK, kao i u ćelijskoj diferencijaciji. Oštećenja DNK značajno povećavaju aktivnost ovog enzima (Stierum i sar., 1994), koji je u pozitivnoj korelaciji sa apoptozom (Stierum i sar., 1994). Nikotinamid inhibira PARP (Sakakibara i sar., 2002; Chong i Maiese, 2008; Maiese i sar.,2009), što

dovodi do smanjenog razlaganja NAD i ima korisne efekte u degenerativnim stanjima gde je povećana aktivnost PARP-a (Virág i Szabó, 2002). Nedavna istraživanja pokazuju da je primena nikotinamida imala neuroprotektivni efekat u animalnim modelima ishemije (Klaidman i sar., 1996; Ayoub i sar., 1999; Mokudai i sar., 2000; Sakakibara i sar., 2000; Maynard i sar., 2001; Ayoub i Maynard, 2002; Sakakibara i sar., 2002) i nakon TPM (Hoane i sar., 2003, 2008; Holand i sar., 2008). Primena B3 nakon kontuzione povrede korteksa poboljšava funkcionalni oporavak i smanjuje ekspresiju GFAP kod povređenih pacova (Hoane i sar., 2003). Dokazano je, takođe, da je B3 efikasan u zaštiti od apoptoze indukovane oksidativnim stresom (Klaidman i sar. 1996; Mukherjee i Adams, 1997).

Nedostatak B3 vitamina izaziva pelagru, bolest koja je praćena promenama na koži, gastrointestinalnim i mentalnim poremećajima. Često se naziva 3D bolešću jer je karakterišu dermatitis, dijareja i demencija. Pečurke i riba su dobri izvori niacina.

1.4.1.4. Vitamin B6 (Piridoksal)



Slika 3D. Vitamin B16 (piridoksin)

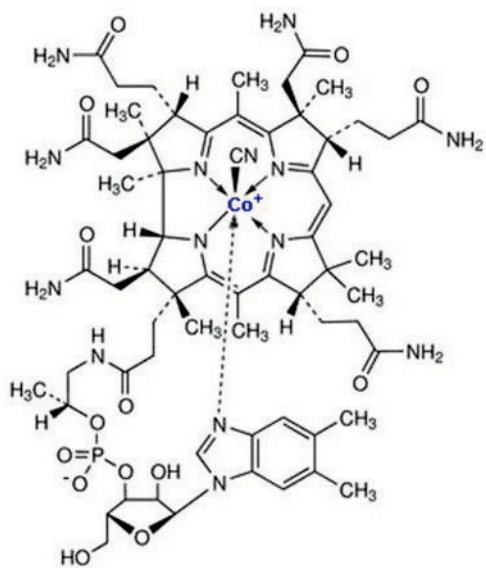
Vitamin B6 (Slika 3D.) obuhvata grupu srodnih jedinjenja: piridoksin, piridoksal i piridoksamin. Oni se u telu metabolišu do piridoksal-fosfata, koji deluje kao koenzim u mnogim važnim reakcijama u krvi, centralnom nervnom sistemu i metabolizmu kože. B6 je važan za biosintezu hema i nukleinskih kiselina, kao i za metabolizam lipida, ugljenih hidrata i amino kiselina. Vitamin B6 se nalazi u raznom povrću i mesu.

B6 je neophodan za pravilno odvijanje procesa koji kontrolišu stvaranje slobodnih radikala. Nedostatak piridoksina može uzrokovati ishemiju, formiranje edema, proizvodnju slobodnih radikala, neurotoksičnost i dugoročna kognitivna oštećenja (Bender, 1999; Cabrini i sar., 1998; Cuskelli i sar., 2001; Friso i sar., 2004). S obzirom na to da su ovi problemi koji se javljaju

kao posledica nedostatka B6 česti posle povrede, pretpostavljeno je da povećanje nivoa piridoksina nakon TPM može imati neuroprotektivni efekat. Zaista, aktivni oblici vitamina B6 ispoljavaju neuroprotektivno dejstvo nakon ishemije (Hwang i sar., 2007). Primena vitamina B6 nakon jednostrane kontuzione povrede senzomotorne kore dovodi do dozno-zavisnog efekta na oporavak funkcije (Kuypers i Hoane, 2010). Poznati su neki od mehanizama neuroprotektivnog dejstva ovog vitamina. Tako, B6 kao prekursor piridoksal-5-fosfata, koji povećava afinitet eritrocita za kiseonik, pomaže da se nadoknadi hipoksično stanje izazvano TPM i time štiti okolno tkivo. Nedostatak B6 vitamina smanjuje aktivnost glikogen fosforilaze (GF) kod glodara (Okada i sar., 1991; Oka, 2001). Ovaj enzim konvertuje uskladišteni glikogen u glukozo-1-fosfat od kog fosforilacijom nastaje glukozo-6-fosfat (G6F). Primena B6 pojačava aktivnost GF, dovodi do povećanja metabolizma glukoze i povećane sinteze G6F, što može da olakša proizvodnju ATP u oštećenim ili hipoksičnim tkivima.

B6 ima anti-ekscitotoksični potencijal. Poznato je da B6 povećava aktivnost glutamat-dekarboksilaze (GAD), enzima koji razgrađuje glutamat (Roberts i sar., 1964). Učestvuje i u razgradnji homocisteina, aminokiseline sa sličnim ekscitotoksičnim dejstvom. TPM povećavaju nivo homocisteina u CNS-u koji aktivacijom NMDA receptora može da dovede do neurotoksičnosti (Lipton i sar., 1997). Za razliku od drugih vitamina B grupe, gde nisu primećene neželjene posledice, dugotrajne primene visokih doza vitamina B6 mogu da uzrokuju neuropatije (Perry i sar., 2004).

1.4.1.5. Vitamin B12 (cijanokobalamin)



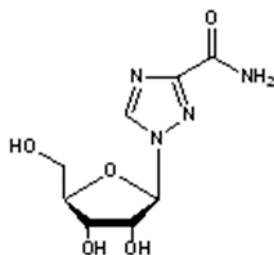
Slika 3E. Vitamin B12 (cijanokobalamin)

Vitamin B12 (Slika 3E.) čine kobalamin i njegovi analozi: cijanokobalamin, hidroskobalamin, adenzilkobalamin i metilkobalamin (MeCbl). Vitamin B12 je neophodan za normalno funkcionisanje nervnog sistema i njegov nedostatak uzrokuje oštećenja bele mase kičmene moždine i mozga, što dovodi do periferne neuropatije (Weber i sar., 1990).

Takođe, neophodan je i za formiranje normalnih crvenih krvnih zrnaca. Njegov nedostatak izaziva megaloblastnu anemiju. B12 se nalazi u školjkama, ostrigama, ćuretini, piletini, govedini i svinjetini. Kompleks B vitamina, uključujući i B12, *in vitro* pospešuje izrastanje neurita (Fujii i sar., 1996). MeCbl štiti kortikalne neurone i ćelije mrežnjače u kulturi od glutamatske citotoksičnosti (Akaike i sar., 1993; Kikuchi i sar., 1997), dok u *in vivo* studijama, visoke doze MeCbl poboljšavaju provodljivost i regeneraciju nerava u različitim animalnim modelima (Yamatsu i sar., 1976; Watanabe i sar., 1994). Pokazano je da je MeCbl najefikasniji od svih B12 analoga u podsticanju izrastanja neurita i preživljavanju neurona. Njegov efekat se ostvaruje preko aktivacije protein kinaza Erk1/2 i Akt (Okada i sar., 2010).

1.5. PRIMENA RIBAVIRINA U TERAPIJI TPM

1.5.1. Ribavirin



Slika 4. Ribavirin

Ribavirin (1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-karboksamid) (Slika 4.) je sintetski nukleozid, analog guanozina, sintetisan od hemijski kombinovanih derivata 1,2,4-triazola-3-karboksida i ribofuranozida (Witkowski i sar., 1972). Postoji u dve izoforme: L i D, pri čemu je L izoforma manje toksična i manje delotvorna od D izoforme (Tam i sar., 2001).

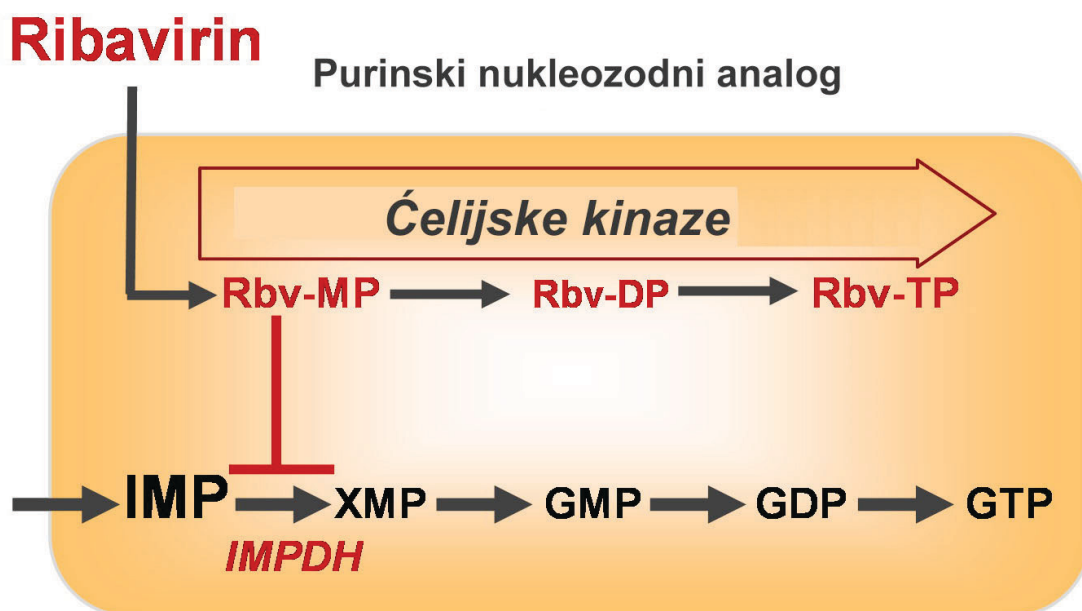
Ribavirin (RBV) pripada grupi antivirusnih lekova i ima širok spektar dejstva na različite tipove DNK i RNK virusa (Crotty i sar., 2000; Yu i sar., 2004). Poslednjih godina koristi se kao jedan od lekova u kombinovanim tretmanima protiv HIV virusa (Soriano i sar., 2007), a pokazano je da ublažava kliničke simptome bolesti kod EAE (Milićević i sar., 2003), animalnog modela multiple skleroze. Uočeno je da ribavirin smanjuje rast tumora ljudskog karcinoma pločastih ćelija *in vivo* (Kentsis i sar., 2004), smanjuje proces reaktivne astroglioze nakon povrede mozga (Peković i sar., 2005) i u EAE-u (Lavrnja i sar., 2012), kao i da može modulirati nocicepciju i lokomotornu aktivnost (Abdel-Salam, 2006).

Ribavirin se primjenjuje oralno, u obliku aerosola ili putem intravenske (*i.v.*), intramuskularne (*i.m.*) i intraperitonealne (*i.p.*) injekcije. Ne vezuje se za proteine plazme, već se transportuje u ćelije olakšanom difuzijom posredstvom uravnotežujućih nukleozidnih transportera (*engl-Equilibrative Nucleoside Transporter-ENT*) ENT1 (Jarvis i sar., 1998), ENT2 (Yamamoto i sar., 2007) ili sekundarno aktivnim transportom koji obavljaju koncentrativni nukleozidni transporteri (*engl-Concentrative Nucleoside Transporter-CNT*) CNT2 (Yamamoto i sar., 2007) i CNT3 (Hu i sar., 2006). Svoje delovanje ribavirin ispoljava nakon aktivacije od strane ćelijskih kinaza koje ga prevode u 5'-fosfatne derivate.

Glavni aktivni metaboliti su ribavirin 5'-trifosfat (RTP) i ribavirin 5'-monofosfat (RMP) (Russmann i sar., 2006).

Ribavirin, odnosno, njegov aktivni metabolit RMP, inhibira enzim inozin monofosfat dehidrogenazu (IMPDH), ključni enzim u *de novo* sintezi guanozin trifosfata (GTP) (Slika 5.) (Carr i sar., 1993; Markland i sar., 2000; Weber i sar., 2003), što ima za posledicu inhibiciju sinteze GTP, čime se indirektno sprečava sinteza nukleinskih kiselina. To je osnova antivirusnog, antitumorskog i imunosupresivnog dejstva nukleozidnih analoga (Pankiewicz, 1999; Tam i sar., 2001).

Enzim IMPDH katalizuje konverziju inozin 5'-monofosfata (IMP) u ksantozin 5'-monofosfat (XMP) i koristi NAD kao primaoca protona (Yamada i sar., 1988). Za enzim se prvo veže IMP, pa NAD. Iz kompleksa prvo disocira NADH, a zatim se oslobađa XMP, koji je u konkurenciji sa IMP za isto mesto vezivanja, dok se NADH vezuje za enzim-XMP kompleks. Ova reakcija je limitirajući korak u *de novo* sintezi guaninskih nukleotida. XMP u sledećem koraku biosinteze formira guanozin-monofosfat (GMP).



Slika 5. Put *de novo* sinteze purinskih nukleotida

Do sada su otkrivene dve tetramerne forme IMPDH (56 kDa). Jedna od formi (IMPDH I) eksprimirana je u normalnim ćelijama, a ekspresija druge forme (IMPDH II) je specifično povećana u neoplastičnim ćelijama i ćelijama koje se ubrzano dele. Obe forme sadrže 514 amino kiselina i pokazuju međusobnu sličnost od 84 % (Markland i sar., 2000). Pokazano je da ribavirin deluje samo na IMPDH II (Franchetti i sar., 1996). U normalnim tkivima IMPDH ima najnižu aktivnost od svih enzima koji učestvuju u biosintezi i degradaciji purina, dok je u mnogim humanim i animalnim tumorskim ćelijama aktivnost ovog enzima, a samim tim i sinteza GTP značajno uvećana (Weber i sar., 1992). Zbog toga blokiranje ovog enzima može biti od značaja u antitumorskoj, antivirusnoj i imunomodulatornoj terapiji. Blokiranjem konverzije IMP u XMP, inhibitori IMPDH vode do smanjenja rezervi guanilata (GMP, GDP, GTP i dGTP) u ćeliji (Griffith i Jarvis, 1996).

Ribavirin ostvaruje svoje dejstvo i vezivanjem za adenozienske receptore, deluje kao selektivni agonist adenozijskih A1 receptora (Franchetti i sar., 1996).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Svako oštećenje CNS-a dovodi do odgovora na povredu, do stvaranja glijskog ožiljka koji predstavlja mehaničku i hemijsku granicu oko mesta povrede. U ovakvom okruženju regeneracija i remijelinizacija aksona u CNS-u su neuspešni, pa je i funkcionalni oporavak slab, za razliku od PNS-a u kome je regeneracija skoro potpuna.

U inicijalnom periodu u kome dolazi do smrti i oštećenja ćelija, neuroprotektivni tretmani su glavno terapijsko oruđe. Tretmani koji su usmereni bilo na regeneraciju aksona, započinjanje remijelinizacije ili zamenu uništenih neurona, moraju da se izbere sa nepermissivnom sredinom u kojoj postoji glijski ožiljak i povećana koncentracija hondroitin-sulfatnih proteoglikana, koji ograničavaju plastičnost u adultnom CNS-u.

Poznato je antiproliferativno dejstvo ribavirina na ćelije koje su u fazi deobe i njegov posredan uticaj na smanjenje koncentracije adenilata, koji mogu da stimulišu astrogliozu. S druge strane, pokazano je da primena pojedinačnih B vitamina ima neuroprotektivni efekat, redukuje reaktivnu astrogliozu i pospešuje motorni oporavak nakon povrede mozga. Stoga je u ovoj tezi ispitivan uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na neurone i ćelije glije, komponente vanćelijskog matriksa, kao i na oporavak lokomotornih funkcija posle jednostrane ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova.

Postavljeni su sledeći eksperimentalni zadaci u kojima se nakon ablacije senzomotorne kore mozga pacova ispituje:

- uticaj B vitamina i ribavirina na oporavak lokomotornih funkcija;
- uticaj B vitamina i ribavirina na ekspresiju molekula uključenih u procese neuronalne plastičnosti:
 - Protein rasta 43 (GAP-43)
 - Proteini asocirani za mikrotubule (MAP-2)
 - Sinaptofizin
 - neurofilamentni proteini;

- uticaj B vitamina i ribavirina na morfološke osobine astrocita, NG2 ćelija i formiranje ožiljnog tkiva;

- uticaj povrede na ekspresiju dve vrste hondroitin-sulfatnih glikozaminoglikana (CS-GAG) sa različitim sulfatisanim motivima: hondroitin-4-sulfat (C-4-S) i hondroitin-6-sulfat (C-6-S) GAG;

- uticaj B vitamina i ribavirina na gensku i proteinsku ekspresiju hondroitin sulfatnih proteoglikana:

- fosfakana
- neurokana
- brevikana

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Eksperimentalne životinje

U ovom radu korišćeni su mužjaci pacova *Wistar* soja, starosti oko 75 dana i prosečne težine oko 290 ± 40 grama na početku eksperimenta. Životinje su dobijene iz vivarijuma Instituta za Biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu. Tokom eksperimenta životinje su boravile u uslovima kontrolisane temperature, vlažnosti i svetlosnog režima (12 sati svetlosti/12 sati tame), sa slobodnim pristupom hrani i vodi, po 3 životinje u kavezu.

Svi eksperimenti su sprovedeni uz saglasnost Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja, Univerziteta u Beogradu (rešenje broj: 46/09, od 06.10.2009. godine), u skladu sa preporukama za rad sa eksperimentalnim životinjama datim u "Vodiču za brigu i korišćenje laboratorijskih životinja" ("Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", National Academy Press, Washington, D. C., 1996).

3.1.2. Reagensi i rastvori

Tabela 1. Reagensi

Naziv	Proizvođač
APS (Ammonium persulfate)	Sigma, Nemačka
Bakar sulfat kristalni ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$)	Zorka, Srbija
BSA (<i>eng.</i> - Bovine serum albumin, Goveđi serum albumin)	Sigma, Nemačka
Citric acid (limunska kiselina, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	Lachema, Češka
Fluorescentne boje za jedra DAPI (4, 6-diamidino-2-fenilindol, Hoechst 33528	Invitrogen, SAD
Fluoro Jade B[®]	Millipore, SAD
Glicin	Sigma, Nemačka
Kalijum permanganat (KMnO_4)	MeiLab, Srbija
Natrij-citrat dihidrat (Tri-Na-citrat, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Kemika, Hrvatska
Natrijum bikarbonat (Na_2CO_3)	Moss Hemos, Srbija
Na tartarat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Chemopol, Češka
Natrijum hidroksid (NaOH)	Merck, Nemačka
Ribavirin (1- β -D-ribofuranozil-1,2,4-triazol-3-karboksiamid)	MP Biomedicals, LLC, Francuska
Saharoza	Sigma, Nemačka
SDS (Sodium dodecyl sulfat)	Sigma, Nemačka
Chromium (III) potassium sulfate dodecahydrate (Hrom kalijum sulfat, KCr(SO₄)₂ × 12H₂O , stipsa)	Sigma, Nemačka
B vitamini B1 Tiamin B2 Riboflavin B3 Nikotinska kiselina B6 Piridoksin B12 Cijanokobalamin	Hemofarm, Vršac
TEMED (N,N,N',N' - Tetramethylethylenediamine)	Sigma, Nemačka
Tris (Tris (hidroksimetil) amino- metan)	SERVA Electrophoresis GmbH, Nemačka
Triton X-100 (t-octylphenoxypolyethoxyethanol)	Sigma, Nemačka
Tween 20	Sigma, Nemačka
Zoletil 50	Virbac, Carros, Francuska
Želatin (Gelatin)	Sigma-Aldrich, SAD

Tabela 2. Rastvori

Naziv	Sastav i proizvođač
0,01 M PBS (<i>eng.</i> - Phosphate buffer saline, Na-fosfatnog pufera)	50 ml 0.2 M PB; 8.7 g NaCl i do 1000 ml mqH ₂ O
0,2 M PB (<i>eng.</i> - Phosphate buffer, fosfatni pufer)	0.2 M NaH ₂ PO ₄ (Merck, Nemačka) 0.2 M Na ₂ HPO ₄ (Merck, Nemačka) mqH ₂ O pH 7,4
Akrilamid-bis rastvor, 29:1	Serva
2-metil butan	Sigma, Nemačka
4% PFA, pH 7,4	40 g paraformaldehid (Sigma, Nemačka) 500 ml dH ₂ O 1M NaOH 500 ml 0.2 M PB
citratni pufer, pH 6	1 g limunske kiseline; 6,10 g Tri-Na-citrat; 500 ml dH ₂ O
DAB (3,3-diaminobenzedine)	DAKO, SAD
DPX (mountant for histology)	Fluka, Švajcarska
Etanol	100%, 96%, 70% Moss Hemos, Srbija
Fiziološki rastvor	0,9% NaCl (Merck, Nemačka)
Folin-Ciocalteu reagens (Folin-Ciocalteu's phenol reagens)	Sigma-Aldrich, SAD. Upotrebljen razblažen sa dejonizovanom vodom u odnosu 1:1.
gel za koncentrovanje (4%)	0.5 M Tris pH 6.8; 30% akrilamid-bis; 10% SDS; 10% APS i 1% TEMED.
gel za razdvajanje (7,5%)	1.5 M Tris pH 8,8; 30% akrilamid-bis; 10% SDS; 10% APS i 1% TEMED.
H₂O₂ (33% vodonik peroksid)	Centrohem, Beograd, Srbija
Luminol	Sigma
Obojeni marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder)	Fermentas
metanol (99,8%)	Moss Hemos, Srbija
Moviol	9,6 g Mowiol-a (Calbiochem, EMD Millipore, SAD); 24 ml glicerola (Lach Ner, Češka)
Normal donkey serum (serum magarca)	Sigma, Nemačka
Normal goat serum (serum koze)	Sigma, Nemačka
Normal horse serum (serum konja)	Sigma, Nemačka
Ponceau S	1% Ponceau S boja; 5% glacijalna sirćetna kiselina; destilovana voda
pufer za elektroforezu	192 mM glicin; 25 mM Tris pH 8,3; 0,1% SDS

pufer za transfer	20% metanol; 192 mM glicin; 25 mM Tris pH 8,3
Reagens A	2% Na ₂ CO ₃ ; 0,4% NaOH; 0,16% Na-tartarat; 1% SDS
Reagens B	4% CuSO ₄ X 5H ₂ O
Reagens C	Reagens A : Reagens B = 100:1
sirćetna kiselina (min. 99,5%)	Kemika, Hrvatska
Pufer za uzorke (2xLaemmli Sample Buffer)	Bio Rad, SAD Pred upotrebu dodati 5% 2-merkaptetanol
TBS	20 mM Tris-HCl pH 7,6; 137 mM NaCl
TBST	TBS + 0,05% Tween 20

Tabela 3. Sterilni rastvori za PCR u realnom vremenu

Naziv	Proizvođač i sastav
DEPC (dietil-pirokarbonat, potentni inhibitor RNKaze)	Sigma, Nemačka
DEPC tretirana voda	1ml 0.1% DEPC 1000 ml dH ₂ O promešati i autoklavirati
Komplet za DNazni tretman	Fermentas, Litvanija 10x reakcioni pufer sa MgCl ₂ DNKaza I/bez RNKaze 25 mM EDTA
Komplet za sintezu cDNK (High Capacity cDNA reverse Transcription Kit)	Applied Biosystems, SAD 10× RT pufer 10× RT nasumični prajmeri 25× dNTP Mix MultiScribe™ Reverzna Transcriptaza
Rastvori za izolaciju RNK	Trizol (Invitrogen, SAD); hloroform (Zorka, Srbija); izopropanol (J.T. Baker, SAD); 70% etanol napravljen u DEPC
SYBR Green (PCR Master Mix gene expression assay)	Applied Biosystems, UK
Ultra čista destilovana voda bez DNKaze i RNKaze upH ₂ O, (UltraPure™ DNase /Rnase Free Distilled Water)	Invitrogen™/GIBCO, SAD
DNaza I bez RNaze	Sigma, Nemačka

3.1.3. Antitela

Tabela 4. Primarna antitela:

Specifičnost	Poreklo	Proizvođač	Razblaženje
2B6 (Chondroitinase generated C-4-S & DS Antibody) Δ DI-4S	miš monoklonsko	ICN Biomedicals	1:50 IHC
3B3 (Chondroitinase generated C-6-S & DS Antibody) Δ DI-6S	miš monoklonsko	ICN Biomedicals	1:50I HC
anti-Actin	miš monoklonsko	Sigma Aldrich	1:7000 WB
anti-Brevican (C-20)	kozapoliklonsko	Santa Cruz	1:500 WB, IF
anti- GAP- 43	zec poliklonsko	Millipore	1:500 IHC 1:1000 WB
anti-GFAP	zec poliklonsko	Dako	1:500 IHC, IF 1:5000 WB
anti-MAP2	miš monoklonsko	Boehringer-Mannheim	1:100 IHC
NeuN	miš monoklonsko	Chemicon	1:500 IF
anti-Neurocan	miš monoklonsko	Santa Cruz	1:500 IHC 1:200 WB
anti-NF200	miš monoklonsko	Millipore	1:200 IHC
anti-NG2	zec poliklonsko	Millipore	1:200 IHC
anti-Phosphacan	miš monoklonsko	Santa Cruz Chemicon	1:500 IHC 1:500 WB
anti-S100 β	miš monoklonsko	Santa Cruz	1:100 IF
anti-SMI31 (phoshorylated)	miš monoklonsko	Covance	1:500 IHC
anti-Synaptophysin	miš monoklonsko	Sigma Aldrich	1:500 IHC 1:250 WB
anti β Tubulin	koza poliklonsko	Santa Cruz	1:500 WB
anti Vimentin	miš monoklonsko	Millipore	1:500 IHC 1:3000 WB

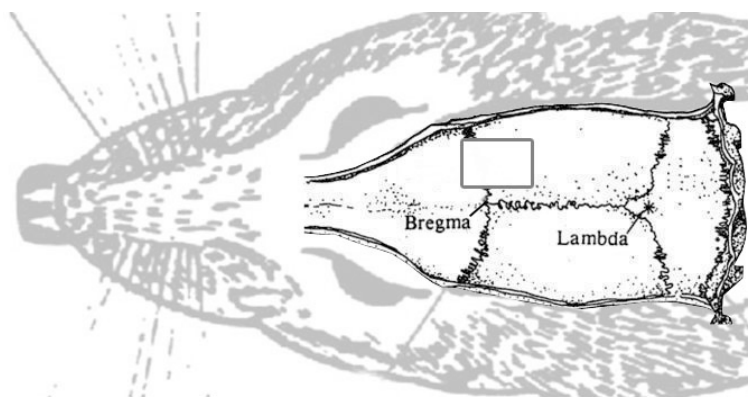
Tabela 5. Sekundarna antitela

Usmereno	Konjugovano sa	Poreklo	Proizvođač	Razblaženje
protiv miša	Biotin	konj	Vector Laboratories	1:50
protiv miša	HRP (peroksidaza rena)	koza	Santa Cruz	1:200
protiv kože	HRP (peroksidaza rena)	magarac	Dako	1:200
protiv zeca	Alexa Flour 488	magarac	Invitrogen	1:200
protiv zeca	Alexa Fluor 555	magarac	Invitrogen	1:200
protiv miša	Alexa Fluor 488	magarac	Invitrogen	1:200
protiv miša	Alexa Fluor 555	magarac	Invitrogen	1:200
protiv kože	Alexa Fluor 555	magarac	Invitrogen	1:200

3.2. METODE

3.2.1. Ablacija senzomotorne kore (ASK) prednjeg mozga pacova

Pre započinjanja operacije pacovi su izmereni i, u skladu sa telesnom masom, anestetizirani Zoletilom u koncentraciji od 50 mg/kg telesne težine (t.t.) intraperitonealno (i.p.). Životinje su fiksirane u stereotaksički ram, obrijane sa gornje strane glave i skalpelom je načinjen rez duž središnjeg dela skalpa kako bi se izložio predeo bregme. Na lobanji je određen položaj desne senzomotorne kore u odnosu na bregmu i središnju liniju prema anatomskom atlasu (Paxinos i Watson, 1986). Na zadatim koordinatama pomoću stomatološkog borera, promera 1 mm, pravi se otvor na kostima lobanje (2 mm ispred bregme, 4 mm iza bregme i 4 mm bočno od središnje linije) (Slika 6.). Pincetom se odvaja koštani poklopac na stranu. Dura (tvrda moždana ovojnica) se pažljivo zaseca i pomera u stranu. Odstranjivanje senzomotorne kore prednjeg mozga pacova vrši se blagim usisavanjem (metoda sukcione ablacije) sive moždane mase kroz tanki polipropilenski nastavak pomoću vakuma, sve do pojave bele mase. Dura se pažljivo vrati u prvobitan položaj preko povređenog dela mozga. Zatim se vrati isečeni koštani poklopac i fiksira pomoću lepljivog zaštitnog flastera, a koža zašije hiruškim koncem.



Slika 6. Adaptiran šematski prikaz koordinata kraniotomije (George Paxinos and Charles Watson: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press, New York, 1998, str. 11).

Lažno operisane životinje (sham kontrola) prolaze ceo operativni postupak kao i životinje kojima je izvršena lezija, jedino što se njima ne otvara

lobanja, nego se samo na odgovarajućim koordinatama bušilicom napravi rez na kosti.

Nakon operacije životinje su provele 3 sata u izolaciji, dok se nisu u potpunosti oporavile od anestezije, a zatim su vraćene u svoje kaveze (n=3) kako bi se izbegao stres usled socijalne izolacije.

3.2.2. Eksperimentalne grupe i tretman životinja

Operisane životinje kojima je ablacijom odstranjen desni senzomotorni korteks podeljene su, prema tretmanu nakon lezije, u 6 grupa (Tabela 6.):

1. **L** grupa - fiziološki rastvor je injeciran i.p. 15 minuta nakon ASK, pa na svaka 24 h do kraja eksperimenta sledećih 14 dana.
2. **LK1** grupa - tretirana kombinacijom vitamina B1 (33 mg/kg/dan), B6 (33 mg/kg/dan) i B12 (0,5 µg/kg/dan) rastvorenim u fiziološkom rastvoru neposredno pred upotrebu. Prva doza je data i.p. 15 minuta nakon ASK, a potom na svaka 24 h do kraja eksperimenta. Period tretiranja trajao je 14 dana.
3. **LK2** grupa - tretirana kombinacijom vitamina B2 (7,5 mg/kg/dan) i B3 (500 mg/kg/dan) rastvorenim u fiziološkom rastvoru neposredno pred upotrebu. Prva doza je data i.p. 15 minuta nakon ASK, a potom na svaka 24 h do kraja eksperimenta. Period tretiranja trajao je 14 dana.
4. **LK** grupa - tretirana kombinacijom pet vitamina: B1, B2, B3, B6 i B12 u prethodno navedenim dozama. Prva injekcija data je i.p. 15 minuta nakon ASK, a potom jednom dnevno do kraja eksperimenta. Period tretiranja trajao je 14 dana.
5. **LR** grupa - Ribavirin je davan i.p. u dozi od 30 mg/kg t.t. od 3 dana nakon ASK, jednom dnevno do kraja eksperimenta. Period tretiranja trajao je 11 dana.
6. **LKR** grupa - tretirana kombinacijom pet vitamina (B1, B2, B3, B6 i B12) i ribavirina u prethodno navedenim dozama. Prva injekcija vitamina data je i.p. 15 minuta nakon ASK, a potom na svaka 24 h do kraja

eksperimenta. Ribavirin je davan jednom dnevno počevši od 3 dana posle ASK pa do kraja eksperimenta.

Tabela 6. Operisane grupe životinja i korišćeni tretmani.

Eksperimentalna procedura	Tretman	Eksperimentalna grupa(skraćenica)	Broj životinja (n)
Lezija (ASK)	Fiziološki rastvor	Lezija + fiz. rastvor (L)	9
	Koktel B ₁ , B ₆ , B ₁₂ (K1)	Lezija + K1 (LK1)	7
	Koktel B ₂ , B ₃ (K2)	Lezija+ K2 (LK2)	7
	Koktel vitamina B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₆ , B ₁₂ (K)	Lezija+ K (LK)	10
	Ribavirin (R)	Lezija+ R (LR)	9
	Koktel vitamina B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₆ , B ₁₂ (K) + Ribavirin (R)	Lezija+ K +R (LKR)	9

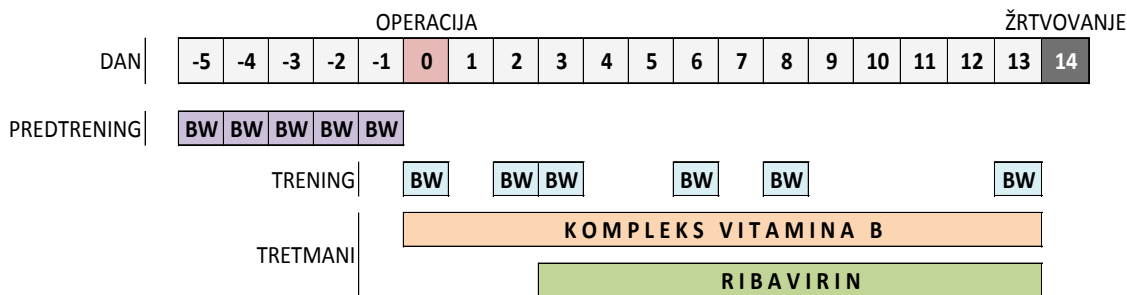
7. Lažno operisane životinje (**SKR**) primale su kombinaciju pet vitamina (B₁, B₂, B₃, B₆ i B₁₂) i ribavirina (Tabela 7.) u prethodno navedenim dozama i vremenima (Slika 7.). Prva injekcija kombinacije vitamina data je i.p. 15 minuta nakon ASK, a potom na svaka 24 h do kraja eksperimenta. Ribavirin je davan jednom dnevno, počevši od 3 dana posle ASK, pa do kraja eksperimenta.

Tabela 7. Intaktne i lažno operisane životinje i njihovi tretmani.

Grupe životinja	Tretman	Eksperimentalnagrupa (oznaka)	Broj životinja (n)
Intaktne	nema	Fiziološka kontrola (F)	4
	Koktel vitamina B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₆ , B ₁₂ (K)	F + K + R (FKR)	4
Lažno operisane (sham)	+ Ribavirin (R)	Sham+K+R (SKR)	8

Intaktne životinje, koje nisu bile podvrgnute operacionoj proceduri podeljene su u dve grupe (Tabela 7.):

8. **F** grupa je bila bez tretmana do kraja eksperimenta.
9. **FKR** grupa je i.p. tretirana kombinacijom vitamina (B1, B2, B3, B6 i B12) i ribavirina u prethodno navedenim dozama i tokom perioda prikazanog na Slici 2.



Slika 7. Shematski prikaz dizajna eksperimenta.

3.2.3. Test prelaska preko grede

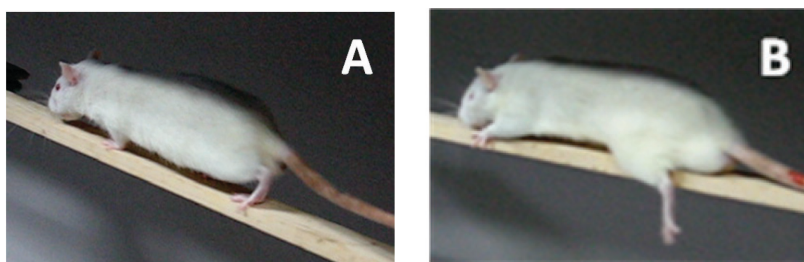
Ispitivanje senzomotorne integracije i koordinacije vršeno je testom prelaska preko grede (*eng.* Beam-walking test, **BW**).

Aparatura (Slika 8.) koju smo koristili za ovaj test sastoji se od 122 cm dugačke i 2,5 cm široke drvene grede, koja se na jednom kraju završava drvenom kutijom (20 x 25 x 24 cm) na kojoj su vrata dimenzija 9,5 x 18 cm (Goldestein i Davis, 1990). Na startnom kraju grede je drvena platforma (10 x 10 cm) iznad koje se, na udaljenosti od 10 cm, nalazi sijalica (100 W) sa usmerenim svetlom. Aparatura je bila uzdignuta od površine podloge na visinu od 50 cm.



Slika 8. Aparatura korišćena za test prelaska preko grede (BW test).

Životinje su postavljane na drvenu platformu i procenjuvana je njihova uspešnost tokom prelaska grede (od startne platforme dok njuškom ne dođu do vrata na kutiji). Za utvrđivanje korektnosti prelaska određivan je procenat omašaja zadnje kontralateralne (u odnosu na leziju) noge u odnosu na ukupan broj koračaja tom nogom (Slika 9.).



Slika 9. Korektan položaj (A) i omašaj (B) kontralateralne noge pri prelasku pacova preko grede.

Na osnovu broja omašaja kontralateralne noge životinjama su dodeljivane sledeće ocene:

0 poena - ukoliko pacov nije mogao da održava ravnotežu i padao je sa grede;

1 poen - ukoliko pacov nije mogao da pređe gredu, ali je održavao ravnotežu na gredi;

2 poena - ukoliko je pokušao da pređe gredu, ali je pao;

3 poena - ukoliko je prelazak izvršen sa više od 50% omašaja onesposobljene noge;

4 poena - ukoliko se greda pređe sa učešćem onesposobljenog ekstremiteta u više od 50% koraka;

5 poena - ako pacov prelazi gredu sa samo jednim omašajem kontralateralne noge;

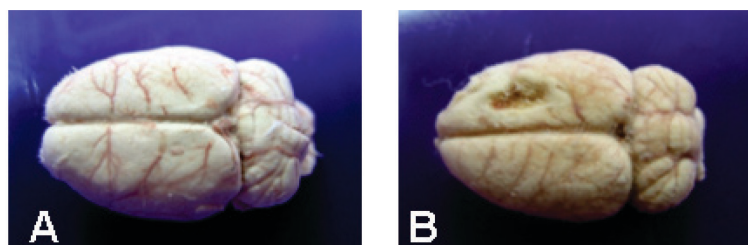
6 poena - za prelazak bez omašaja.

Obuka (predtraining) životinja se sprovodila u periodu od 5 dana pre planirane operacije (Slika 7.), svakoga dana u isto vreme. Prvog dana obuke, svaka životinja je prošla kroz seriju od tri probna prelaska. Prilikom prvog prelaska životinja je postavljena na udaljenost od 5 cm od ciljne kutije. Kod drugog prelaska postavljena je na polovinu grede na oko 60 cm udaljenosti od cilja. Prilikom trećeg prelaska životinja je postavljena na početnu platformu. Narednih dana obuka se nastavljala tri puta dnevno dok sve životinje nisu bile u stanju da u potpunosti izvrše prelazak.

Životinje su testirane pre operacije, a zatim 2, 3, 6, 8 i 13 dana posle operacije (Slika 7.).

3.2.4. Izolacija tkiva

Ipsilateralna kora mozga je izolovana na hladnoj površini, kako bi se ublažilo dejstvo proteolitičkih enzima. Uzorci kore mozga su pulovani (n=2 za izolaciju proteina; n=3 za izolaciju RNK), homogenizovani i čuvani su na -80°C do upotrebe. Za histološko bojenje i imunohistohemijsku analizu izolovani su celi mozgovi (n=3 životinje po grupi) (slika 10.).



Slika 10. Fotografija izolovanog celog mozga kontrolne (A) i operisane (B) životinje.

3.2.5. Histološke analize

3.2.5.1. Priprema tkiva

Životinje su dekapitovane 7 i 14 dana nakon operacije, mozgovi su izolovani i fiksirani u 4% PFA (12 h, na 4°C), nakon čega su dehidratirani kroz seriju rastvora sa rastućim koncentracijama saharoze (10%, 20% i 30%) u 0,2 M fosfatnom puferu (pH 7,4) na 4°C. Tkivo je zatim zamrznuto u 2-metil butanu na -80°C, uvijeno u parafilm i zamrznuto na -80°C do upotrebe.

Mozgovi su isečeni na kriotomu (Leica). Koronalni preseki debljine 16 µm i 25 µm lepljeni su na prethodno želatinizirane mikroskopske pločice (u rastvoru 0,5% želatina u koji je dodato 0,05% stipse) i radi fiksacije ostavljeni nekoliko sati da se osuše na sobnoj temperaturi (ST). Nakon toga čuvane su na -20°C do daljeg korišćenja.

3.2.5.2. Imunohistohemijske metode

Imunohistohemijsko (*eng.* immunohistochemistry-IHC) bojenje je proces lokalizacije proteina na preparatima tkiva koji se zasniva na principima reakcije antigen-antitelo. Za uočavanje ove interakcije koristili smo **imunoperoksidazno** bojenje, gde je primarno antitelo neobeleženo, a sekundarno je konjugovano sa biotinom ili enzimom peroksidazom rena (*engl.* Horse Radish Peroxidase, HRP) koja može da pokrene bojenu reakciju. Kao hromogen za ovakav tip reakcije je korišćen DAB, koji nakon razlaganja enzimom peroksidaza rena razvija specifičnu braon boju. Takođe, radili smo i **imunofluorescentno** (IF) bojenje, kada se na primarno neobeleženo antitelo veže sekundarno antitelo konjugovano sa nekom fluorescentnom bojom.

- Čitav postupak se odvija na ST, osim inkubacije u primarnom antitelu koja se odvija na 4°C. Svi rastvori su pravljani u 0,01 M PBS-u, pH 7,4 koji je služio i za ispiranje nakon određenih proceduralnih koraka.
- Za bolju detekciju antigena, pre postupka imunohistohemije, koristili smo tehniku demaskiranja antigena (antigen retrieval) u vrelom citratnom puferu pH 6, koja ima za cilj bolje otkrivanje antigena, jer u

toku fiksacije tkiva dolazi do formiranja kovalentnih veza između aldehida iz fiksativa i antigena.

- Nakon ispiranja, pločice se inkubiraju 20 minuta u 3% vodonik peroksidu i 10% metanolu, da bi se blokirala endogena peroksidaza. Blokiranje se vrši kako ne bi došlo do stvaranja nespecifičnih signala od strane endogene peroksidaze prilikom vizuelizacije antigena.
- Preseci se nakon ispiranja inkubiraju oko 60 minuta u odgovarajućem 5% serumu. Na taj način se blokiraju sva mesta nespecifičnog vezivanja antitela.
- Ovako pripremljeni preseci su ostavljeni preko noći na 4°C u rastvoru primarnog antitela u PBS-u (koji je sadržao i odgovarajući 1% blokirajući serum i 0,1% Triton X-100). Nevezana antitela su uklonjena dužim ispiranjem u PBS-u.
- Zatim su, u zavisnosti od prirode primarnog antitela, stavljena sekundarna antitela koja se specifično vezuju za već prisutna primarna antitela (korišćena primarna i sekundarna antitela kao i njihova razblaženja mogu se naći u Tabelama 4. i 5.).
- Nakon ispiranja, za vizuelizaciju imunokompleksa, korišćen je DAB koji reaguje sa peroksidazom rena i u prisustvu H₂O₂ proizvodi kompleks braon boje. Reakcija je prekinuta ispiranjem u česmenskoj, pa u destilovanoj vodi. Za sekundarna biotinizovana antitela pre vizuelizacije kompleksa vršena je inkubacija sa ABC kompleksom (Vectastain ABC kit, Vector laboratories).
- Potom su preseci dehidratirani kroz seriju alkohola (70%, 96% i 100% etanol), po 5 minuta u svakoj koncentraciji i prosvetljeni u ksilolu. Za montiranje preparata, na pločice sa presecima se nanosio DPX i pokrovna stakalca.

Preseci su analizirani ili na Axio imager (Zeiss) mikroskopu i fotografisani digitalnom kamerom ili na foto mikroskopu Leica DMRB, sa uveličanjem objektiva 2,5x; 5x; 10x; 20x i 40x.

Imunofluorescentno bojenje rađeno je po sličnom protokolu kao i imunoperoksidazno. Izbačen je samo korak blokiranja endogene peroksidaze. Kao sekundarno antitelo korišćeno je antitelo obeleženo fluorescentnom bojom. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom i ispiranja preseka pločice su montirane moviolom.

Kontrole za IHC i IF su prošle kroz istu proceduru kao i svi preseci osim što je izostavljen korak sa primarnim antitelom. Kod takvih kontrola nije bilo imunopozitivne reakcije, što je ukazivalo na odsustvo nespecifičnog vezivanja antitela. Čelije su slikane Zeiss Axiovert mikroskopom (Axio Observer Microscope Z1, ZEISS). Kolokalizacija na fluorescentnim slikama određena je upotrebom AxioVision Rel. 4.6 programa, koji ide uz Zeiss Axiovert mikroskop.

3.2.5.3 Fluoro-Žad B i Hoëchst 33528 bojenje

Fluoro-Žad B (FJB) boja je korišćena za detekciju neurona u procesu degeneracije po protokolu koji su uspostavili Schmued i Hopkins (2000). Pločice su prvo sušene 20 minuta na 50°C i ohlađene na ST. Potom su uranjane redom u: 1% rastvor natrijum hidroksida u 80% etanolu (5 minuta), 70% etanol (2 minuta), destilovanu vodu (2 minuta), 0,06% rastvor kalijum permanganata (10 minuta). Zatim su ispirane u destilovanoj vodi (2 minuta) i prebačene u rastvor FJB boje. Radni rastvor boje (0,0004%) je napravljen dodavanjem 4 ml koncentrovanog rastvora (0,01% rastvor boje u destilovanoj vodi) u 96 ml 0,1% rastvora sirćetne kiseline. Posle 20 minuta bojenja pločice su ispirane 3 puta po 1 minut u destilovanoj vodi, a zatim uronjene u 0,01% vodeni rastvor Hoechst 33258 boje (koristi se za analizu stanja hromatina) 10 minuta. Posle ispiranja 3 puta po 1 minut u destilovanoj vodi i sušenja na ST, pločice su stavljene u ksilol (2 minuta) radi potpune dehidracije, na preseke je nanet DPX i stavljeno pokrovno staklo. Kao negativna kontrola koristile su pločice sa presecima koje su prošle isti postupak osim što nisu izlagane dejstvu FJB i Hoechst boje već 0,1% rastvoru sirćetne kiseline.

Za dvojna bojenja prvo je rađeno imunofluorescentno, a potom FJB bojenje. Bojenja su pratila prethodno opisane protokole, samo je vreme inkubacije preseka u kalijum permanganatu skraćeno na 5 minuta.

Preseci su analizirani na mikroskopu Axio Observer Microscope Z1, ZEISS. Neuronu u procesu degeneracije koje obeleži FJB boja se jasno razlikuju od pozadine jer se vide kao zasebne fluorescentno zelene tačke u odnosu na crnu pozadinu.

3.2.6. Izolovanje tkiva i određivanje koncentracije ukupnih proteina

Proteini su izolovani iz tkiva ipsilateralne kore prednjeg mozga svih eksperimentalnih grupa. Tkivo je homogenizovano u 10 zapremina vrućeg (60°C) 1% SDS-a sa 20 zaveslaja, sonifikovano i do dalje analize uzorci su čuvani na -80°C.

Za određivanje koncentracije proteina u uzorcima je korišćena metoda po Markwell-u i sar., (1978) koja predstavlja modifikaciju metode Lowry i sar., (1951). Ova metoda omogućava korišćenje uzoraka koji sadrže komponente membrana i lipoproteine bez prethodne solubilizacije ili ekstrakcije lipida. Svi koraci su rađeni na ST. U 890 µl dejonizovane vode dodato je 10 µl uzorka, čiju koncentraciju proteina određujemo, a zatim i 100 µl 1M NaOH. Nakon 10 minuta dodato je 2 ml reagensa C, a posle 15 minuta inkubacije dodato je i 300 µl Folin-Chicalteau-vog reagensa (FC:dH₂O=1:1). Posle 45 minuta inkubacije očitana je apsorbancija na 750 nm na spektrofotometru Shimadzu UV-160. Koncentracija uzorka određena je iz standardne krive dobijene upotrebom poznatih koncentracija proteina BSA.

3.2.7. Elektroforeza proteina

Elektroforetsko razdvajanje proteina prema molekularnoj težini vršeno je na SDS denaturišućim poliakrilamidnim gelovima u diskontinuiranom sistemu – SDS-PAGE (*engl.* Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Korišćena je mini aparatura za elektroforezu (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories).

Za detekciju proteina od interesa u ovom radu korišćeni su 7,5% gel za razdvajanje i 4% gel za koncentrovanje. Razdvajanje proteinskih traka se znatno povećava upotrebom gela za koncentrovanje (stacking gel), koji se nalazi iznad gela za razdvajanje (resolving gel). Razlika u pH i u sastavu ova dva gela dovodi do koncentrovanja uzoraka u usku traku pre separacije u gelu za razdvajanje. Na ovaj način je omogućen istovremeni ulazak proteina u gel za razdvajanje.

3.2.7.1. Priprema uzoraka proteina za SDS-PAGE

Pufer u kome se pripremaju uzorci proteina za SDS-PAGE označen je kao pufer za uzorke (2X Laemmli Sample Buffer). Uzorci su pripremljeni u 2X puferu u odnosu 1:1 (v/v) i denaturisani kuvanjem 5 minuta na 95°C. Kao standard za molekulsku težinu korišćen je obojeni marker opsega od 10 do 170 kDa .

Količina proteina koja je nanošena na gel optimizovana je eksperimentalno za svaki protein preko krivih sa sukcesivnim razblaženjima proteina, a koncentracija primarnih antitela je uzeta po preporuci proizvođača. Kao optimalna količina proteina uzeta je ona koja se nalazila u linearnom opsegu krive zavisnosti intenziteta signala i količine nanesenih proteina.

U gelu za koncentrovanje su napravljeni bunarići u koje su sipani uzorci u finalnoj koncentraciji od 10 µg (GFAP, Vimentin) ili 30 µg (brevikan, fosfakan, neurokan). Elektroforeza je vršena u puferu za elektroforezu pri konstantnom naponu od 120 V na ST.

3.2.8. Western blotting

Prenos proteina sa SDS-poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu i imunološka detekcija imobilizovanih proteina

Pošto su proteini elektroforetski razdvojeni prenose se sa poliakrilamidnog gela na PVDF membranu (Roche). Nakon završene elektroforeze gel za razdvajanje je inkubiran 15 minuta u puferu za transfer da bi se sprečilo njegovo skupljanje tokom transfera. Nitrocelulozna membrana se

aktivira u metanolu 15 sekundi, ispiri u destilovanoj vodi 2 minuta, a zatim inkubira 20 minuta u puferu za transfer.

Za transfer je korišćen sistem Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories). Metoda se zasniva na kretanju negativno naelektrisanih proteina ka pozitivnom polu u električnom polju. Tako proteini prelaze sa gela na nitroceluloznu membranu, koja se nalazi bliže anodi. Transfer proteina ide preko noći pri konstantnom naponu od 30 V na 4°C.

Po završenom transferu membrane su obojene Ponceau S bojom radi vizuelizacije proteinskih traka i potvrde uspešnosti transfera.

3.2.9. Imunoblot analiza

Posle završenog transfera proteina, nitroceluloze su inkubirane u 5% BSA u TBST-u, da bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela. Nakon ispiranja (sva ispiranja su vršena u TBST-u, obično 3 puta po 10 minuta), membrane su ostavljene u primarnom antitelu (razblaženo u TBST-u) preko noći na 4°C. Posle ispiranja membrane su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelom obeleženim HRP. U tabelama 4. i 5. dat je prikaz svih antitela koja su korišćena u ovoj metodi kao i njihove koncentracije.

Nakon ispiranja membrane su izložene dejstvu luminola 2 minuta, očeđene i izložene autoradiografskom filmu (Kodak) osetljivom na plavu svetlost u trajanju od 1 do 20 minuta, u zavisnosti od korišćenog antitela. Filmovi su razvijeni i skenirani radi dalje analize dobijenih signala.

3.2.10. Semikvantitativna analiza imunoblotova

Intenzitet dobijenih signala kvantifikovan je denzitometrijski, korišćenjem kompjuterskog programa za analizu signala (ImageQuant 5.2). Vrednosti dobijene za ciljne proteine su normalizovane u odnosu na β -aktin, odnosno β -tubulin, kao kontrolu za nanetu količinu totalnih proteina. Tako dobijene relativne vrednosti su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje.

3.2.11. RT-PCR

PCR (*eng.* - polymerase chain reaction) je postupak umnožavanja ciljne sekvence DNK ili RNK, koji se zasniva na lančanoj reakciji polimeraze. Za ovu reakciju je potrebna DNK matrica ili iRNK (ova metoda uključuje korak reverzne transkripcije kako bi se dobila cDNK, a takav PCR se naziva RT-PCR), amplimeri, dezoksiribonukleotidi, pufer i enzim DNK zavisna DNK polimeraza koji katalizuje ugrađivanje nukleotida u novi lanac DNK.

U ovom eksperimentu urađena je analiza promena na nivou iRNK metodom semikvantitativnog RT-PCR u realnom vremenu (*eng.* quantitative real time polymerase chain reaction, Q-PCR/qRT-PCR). Metoda najpre obuhvata korak reverzne transkripcije u kome se ukupna iRNK prevodi u cDNK, i potom korak umnožavanja dela cDNK od interesa. Proces umnožavanja se izvodi u seriji cikličnih izmena temperatura čime se obezbeđuje denaturacija molekula DNK, hibridizacija amplimera sa matricom i njegovo izduživanje (elongaciju). Kod PCR-a u realnom vremenu u svakom ciklusu PCR-a se prati zastupljenost sintetisanog produkta, što omogućava pouzdanu kvantifikaciju nivoa ekspresije ispitivanog gena.

3.2.11.1. Izolacija RNK

Ukupna RNK je izolovana iz 100 mg tkiva ipsilateralne kore prednjeg mozga svih eksperimentalnih grupa Trizol reagensom, prema protokolu proizvođača. Specifikacija rastvora korišćenih za izolaciju RNK data je u Tabeli 3. Postupak izolacije se sastojao iz nekoliko koraka:

- 1. Homogenizacija** - na 100 mg tkiva doda se 1 ml trizol reagensa (monofazni rastvor fenola i guanidin izotiocijanata).
- 2. Razdvajanje faza** - homogenizovani uzorci su inkubirani 5 minuta na ST, da bi nukleoproteinski kompleksi u potpunosti disosovali, a potom je dodato 0,2 ml hloroforma na 1 ml trizola. Tube su vorteksovane dok rastvor nije postao beo, a potom je usledila inkubacija na ST (3 minuta). Uzorci su potom centrifugirani na 12000g, 15 minuta, 4°C. Smeša se na

taj način razdvaja na tri sloja: donji crvenkasti (DNA), srednji beli prsten (proteini) i gornju bezbojnu fazu u kojoj se nalaze RNK molekuli.

3. **Precipitacija RNK** - gornja faza je prenetu u nove tubice u koje je dodato 0,5 ml izopropanola (na početnu zapreminu trizola od 1 ml), a potom su tubice snažno izvorteksovane. Uzorci su inkubirani 24 h na -80°C , a onda odleđeni i centrifugirani na 12000g , 10 minuta, 4°C . RNK se na ovaj način staložila na dnu tubica u vidu beličastog taloga.
4. **Ispiranje RNK** - iz tubica je uklonjen supernatant. Talog RNK je ispran sa 0,5 ml hladnog 75% etanola (napravljen od apsolutnog etanola u 0.1% DEPC), vorteksovano dok se talog nije odlepilo od dna nakon čega je usledilo centrifugiranje na 7500g , 5 minuta, 4°C . Ispiranje u etanolu je ponovljeno još jedanput.
5. **Rastvaranje RNK** - etanol je odliven, a tubice su ostavljene desetak minuta da se talog osuši. Talog ne sme da se presuši, jer se time smanjuje njegova rastvorljivost. Nakon sušenja, RNK je rastvorena u 50 do $100\ \mu\text{l}$ upH₂O na ledu, provlačenjem kroz pipetu nekoliko puta, potom vorteksovanjem.

Pre skladištenja na -80°C spektrofotometrijski je određena koncentracija RNK u uzorcima, a intaktnost izolovane RNK proverena na 1% agaroznom gelu.

3.2.11.2. DNazni tretman i reakcija reverzne transkripcije

Pre reakcije reverzne transkripcije (RT), izolovana ukupna RNK tretirana je DNazom I kako bi se uklonila sva eventualno zaostala DNK, koja pri PCR reakciji može dati lažan rezultat u pogledu genske ekspresije. Tretman DNazom I je izveden po protokolu proizvođača, tako što je $1\ \mu\text{g}$ ukupne RNK inkubiran sa 1U Dnaze I tokom 30 min na 37°C . DNaza I je inaktivirana dodavanjem 25 mM EDTA i inkubacijom 10 min na 65°C . Konačna zapremina po uzorku posle DNaznog tretmana je $10\ \mu\text{l}$ u kojoj se nalazi $1\ \mu\text{g}$ RNK (tj. $0.1\ \mu\text{g}$ RNK/ $\ \mu\text{l}$

uzorka). Nakon ove reakcije može se započeti RT reakcija, bez dodatnih prečišćavanja.

Reverzna transkripcija je reakcija u kojoj se na osnovu RNK molekula kao matrice, sintetiše komplementarni lanac molekula DNK (cDNK). Za reakciju sinteze cDNK neophodan je enzim reverzna transkriptaza (RNK zavisna DNK polimeraza), dezoksiribonukleotidi, inhibitor enzima RNaze i prajmer za početak sinteze molekula cDNK. Kao prajmeri mogu poslužiti nasumični (eng. – random) heksameri, 3' prajmeri i oligo-dT niz od 12 – 18 dTTP nukleotida. Za RT korišćen je komplet za sintezu cDNK sa nasumičnim heksamerima. Reakciona smeša u zapremini od 20 μ l je sadržavala: 2 μ l 10x RT pufera, 0.8 μ l 25xdNTP Mix-a (100 mM), 2 μ l 10x nasumičnih RT prajmera, 1 μ l MultiScribe reverzne transkriptaze, 4.2 μ l DEPC-om tretirane vode i 10 μ l uzorka koji sadrži 1 μ g RNK. Potom je reakciona smeša prošla kroz 4 termalna ciklusa za sintezu cDNK:

1. 10 min/ 25°C
2. 120 min/ 37°C
3. 5 min/ 85°C
4. Skladištenje na 4°C, gde može da stoji neograničen vremenski period

3.2.11.3. PCR u realnom vremenu

Nivo ekspresije gena od interesa je određivan u odnosu na nivo ekspresije nekog kontrolnog gena koji se paralelno umnožava. Ovaj kontrolni gen se još naziva endogena ili interna kontrola i predstavlja gen koji ima konstitutivan nivo ekspresije u jednom tipu ćelija ili tkivu, nezavisno od sredinskih faktora, stanja u kome se ćelija nalazi ili eksperimentalne procedure kojoj je podvrgnuta. Primena endogene kontrole neutrališe tehničke greške u proceni ekspresije gena od interesa.

Za praćenje DNK sinteze koristili smo fluorescentnu boju SYBR green, koja se vezuje za dvolančanu, ali ne i jednolančanu DNK. Reakciona smeša za amplifikaciju ciljnih gena i endogene kontrole (β -aktin) je sadržala: SYBR

Green, cDNK (tj 10 ng iRNK prevedene u cDNK), i prajmere za transkripte prikazane u tabeli 8. Za reakcije lančane polimerizacije je korišćen aparat ABI Prism 7000 i sledeći program amplifikacije:

- 2 min na 50°C
- 10 min na 95°C
- 40 ciklusa po 15 sekundi na 95°C
- 1 minut na 60°C

Potom je određena vrednost eksperimentalnog praga reakcije (*eng.* - threshold), a na osnovu nje Ct vrednost (*eng.* - cycle at threshold). Rezultati su prikazani kao razlika u broju ciklusa kojim se dostiže vrednost eksperimentalnog praga reakcije za ispitivane gene u odnosu na nivo ekspresije endogene kontrole (endogeni referentni standard): ($\Delta Ct = Ct_{ciljni\ gen} - Ct_{kontrola}$).

Tabela. 8. Prajmeri za transkripte

Geni	Sekvence prajmera
β -actin	Forward - AGATTACTGCCCTGGCTCCT Reverse - ACATCTGCTGGAAGGTGGAC
Brevikan	Forward - CCTCAGGAAGCTGTGGAGAG Reverse - CTTGCCCCATCTGGAGTAGA
GFAP	Forward - CTCCTATGCCTCCTCCGAGACGAT Reverse - GCTCGCTGGCCCGAGTCTCTT
Fosfakan	Forward - TTGACAAGTGATGAAGAGAGTGG Reverse - AATCAGCACATCTCGTTCTATCC
Neurokan	Forward - TTTCAGTCCACAGCGATCAG Reverse - AGGAGAGGGATACAGCAGCA
Vimentin	Forward - GCAAAGCAGGAGTCAAACGA Reverse - CGTTTCGTCCTCAGTTTGCT

Kvantifikacija je urađena $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodom (Livak i Schmittgen, 2001). Rezultati su izraženi kao stepen promene u odnosu na kontrolnu grupu koju je predstavljala intaktna netretirana grupa životinja (F). Kontrolnoj grupi je dodeljena vrednost od 100 % (srednja vrednost \pm standardna greška).

3.2.12. Statistička obrada podataka

Svi numerički parametri su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ili u procenatima \pm standardna greška. Značajnosti u razlikama između tretiranih i kontrolnih grupa procenjivane su testom ANOVA i korigovane Tukey metodom. Verovatnoća nulte hipoteze manja od 0.05 smatrana je statistički značajnom ($p < 0,05$), a za $p < 0.005$ visoko značajnim.

4. REZULTATI

4.1. UTICAJ RAZLIČITIH KOMBINACIJA B VITAMINA I RIBAVIRINA NA OPORAVAK MOTORNE FUNKCIJE NAKON POVREDE PREDNJEG MOZGA PACOVA (TEST PRELASKA PREKO GREDE - BW TEST)

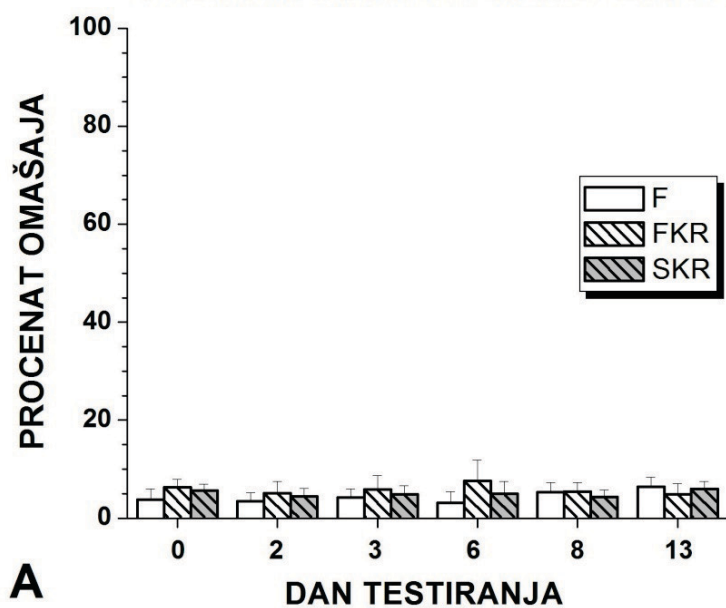
Oporavak lokomotorne funkcije zadnjeg kontralateralnog (u odnosu na mesto povrede) ekstremiteta nakon jednostrane ablacije senzomotorne kore (ASK) prednjeg mozga praćen je primenom BW testa. Ovaj test meri sposobnost pacova da pređe visoku usku gredu. Naime, iako kretanje na ravnoj površini nije narušeno nakon ovakve povrede, pacovi ispoljavaju smanjenu koordinaciju, što se uočava prilikom prelaska uske grede (širine 2,5 cm, aparatura opisana u poglavlju Materijal i metode). Dve do tri nedelje nakon povrede pacovi se oporavljaju, tako da se nakon ponovljenih testiranja lokomotorna koordinacija vraća na početni nivo. Budući da oporavak može biti modulisan, na primer, primenom nekih lekova, u našem eksperimentu BW testom hteli smo da utvrdimo da li su tretmani koji su ispitivani uticali na oporavak narušenih motornih funkcija.

4.1.1. Lokomotorna koordinacija kod kontrolnih grupa životinja

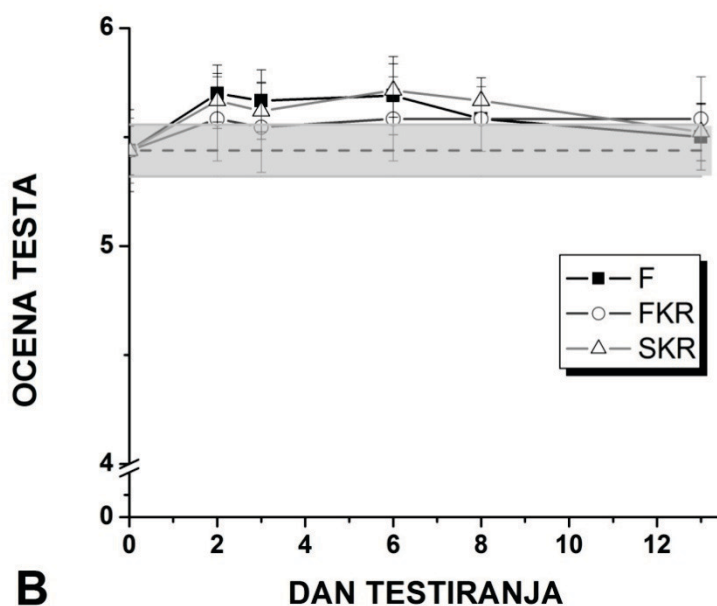
Životinje su trenirane 5 dana pre početka eksperimenta i testirane su neposredno pre operacije (nulti dan), kako bi se odredio bazalni stepen lokomotorne koordinacije (ukupna ocena svih životinja u nultom danu predstavljena je isprekidanom linijom u sivoj zoni na slikama 11. B, 12. B i 13. B). U nultom danu, životinje su izvršavale zadatak sa malim brojem ispada i visokom prosečnom ocenom (Slika 11., 12. i 13.).

Ovakav trend se zadržao kod kontrolnih životinja (F, FKR, SKR) u svim posmatranim danima (Slika 11.A, B), tj. nije bilo značajne razlike u ostvarenim rezultatima između te tri grupe.

TEST PRELASKA PREKO GREDE



A



B

Slika 11. Rezultati BW testa kontrolnih i lažno operisanih životinja tretiranih kombinacijom B vitamina i ribavirina (FKR i SKR), kao i intaktne kontrole (F). A) Grafik pokazuje procenat nepravilnih postavljanja kontralateralne noge na gredu u odnosu na ukupan broj koraka pri prelasku \pm SEM. B) Na osnovu broja omašaja noge životinjama su dodeljivane odgovarajuće ocene. Na ordinati su prikazane srednje vrednosti ocena za datu grupu \pm SEM. Ukupna ocena svih životinja u nultom danu predstavljena je isprekidanom linijom u sivoj zoni (srednja vrednost \pm SEM).

4.1.2. Uticaj ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova na lokomotornu koordinaciju

U narednom eksperimentu praćene su promene lokomotorne koordinacije pacova prilikom prelaska grede nakon ASK.

Drugog dana posle ASK uoćen je znatan pad lokomotorne koordinacije, jer je registrovano 77% omašaja leve zadnje noge (kontralateralne u odnosu na mesto povrede) (Slika 12. A). Narednih dana primetan je trend poboljšanja lokomotorne koordinacije što je potvrđeno smanjenjem broja omašaja u odnosu na 2. dan (Slika 12. A) i to za 14% u 3. danu, 50% u 6. danu, 52% u 8. danu i 59% u 13. danu. Dobijene su i bolje ocene u narednim danima (Slika 12. B). Međutim, konačan skor nije dostigao vrednost ostvarenu pre povrede. U 13. danu srednja ocena grupe predstavlja 80% vrednosti ostvarene u svim grupama u nultom danu (isprekidana linija u sivoj zoni) (Slika 12. B).

4.1.3. Uticaj različitih kombinacija B vitamina na oporavak lokomotorne koordinacije nakon ablacije senzomotorne kore

U narednom setu eksperimenata ispitan je uticaj sledećih kombinacija B vitamina:

- B1 + B6 + B12 (LK1)
- B2 + B3 (LK2)
- B1 + B2 + B3 + B6 + B12 (LK)

Drugog dana nakon povrede dolazi do znatnog smanjenja lokomotorne koordinacije i značajnog povećanja broja omašaja u svim eksperimentalnim grupama. Međutim, uočava se da procenat omašaja zadnje leve šapice zavisi od tretmana koji je primenjen (77% omašaja u L grupi, 81% u LK1, 59% u LK2 i 53% u LK). Takođe, i brzina oporavka koordinacije lokomocije nakon povrede nije bila ista u svim grupama. Brzina oporavka značajno je veća u grupama koje su primile svih pet vitamina (LK), ili kombinaciju B2 i B3 vitamina (LK2) u odnosu na L i LK1 grupu (Slika 12. A, B; *p < 0,05; ***p < 0,005).

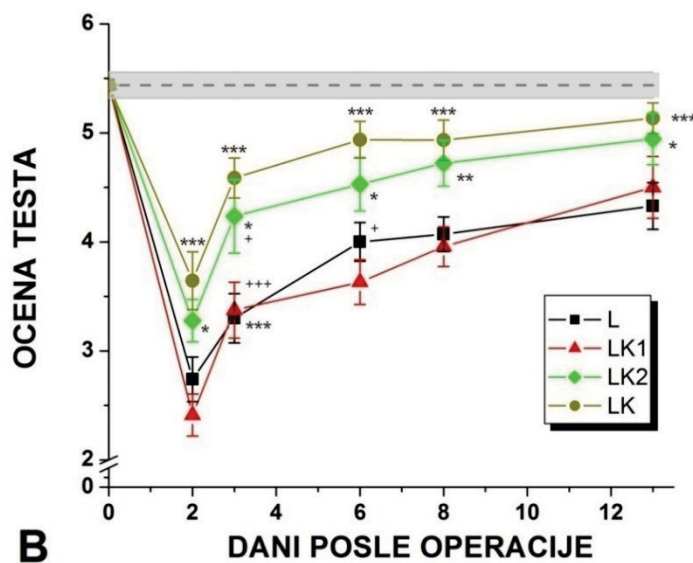
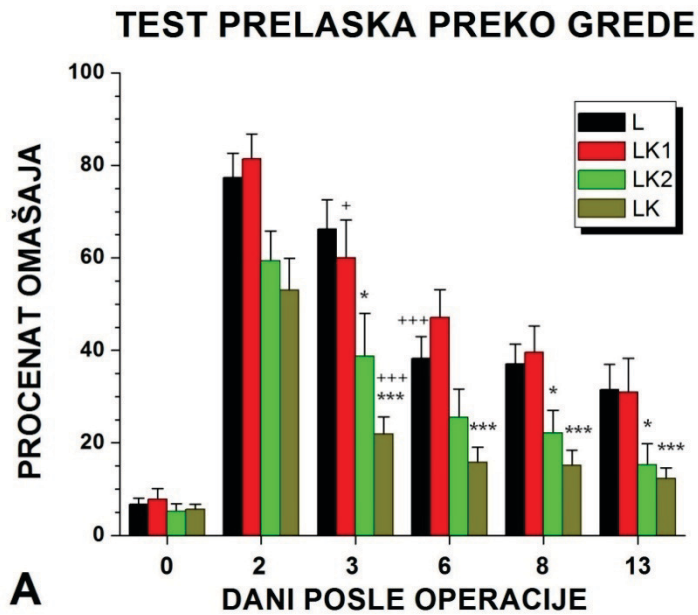
U LK grupi procenat omašaja značajno je smanjen u odnosu na odgovarajuću L grupu (Slika 12. A), i to u 2. danu za 31%, u 3. danu za 67%, u 6.

danu za 58%, u 8. danu za 59% i u 13. danu za 61% (** $p < 0,005$). Takođe, ove životinje su ostvarile i više ocene u svim posmatranim danima u odnosu na životinje iz L grupe (Slika 12. B): 33% u 2. danu, 39% u 3. danu, 23% u 6. danu, 21% u 8. danu i 19% u 13. danu (** $p < 0,005$).

Statistički značajno poboljšanje lokomotorne koordinacije ($p < 0,05$), primećeno je i u LK2 grupi, što je potvrđeno smanjenjem broja omašaja (Slika 12. A) i to za 23% u 2. danu, 41% u 3. danu, 33% u 6. danu, 40% u 8. danu i 51% u 13. danu, kao i boljim dobijenim ocenama (Slika 12. B): višim za 20% u 2. danu i 28% u 3. danu ($p < 0,05$), 13% u 6. danu, 16% u 8. danu i 14% u 13. danu u poređenju sa L grupom.

Kao i u ostalim grupama i kod LK1 grupe statistički značajno smanjenje lokomocije uočeno je 2. dana nakon ASK. Međutim, trend oporavka motorne koordinacije u narednim danima kod životinja iz ove grupe nije se značajno razlikovao od L grupe (Slika 12. A, B), osim u 6. danu kada je kod LK1 životinja uočeno 23% više grešaka pri izvođenju BW testa ($p > 0,05$) (Slika 12. A).

Iako u svim ispitivanim grupama dolazi do oporavka motorne koordinacije nakon ASK, brzina oporavka nije bila ista u svim grupama i zavisila je od korišćenog tretmana. Uočeno je da se broj omašaja u danima posle povrede najbrže smanjuje u LK grupi i da ove životinje 14. dana posle operacije postižu srednju ocenu koja iznosi 94% vrednosti ostvarene u svim grupama u nultom danu (isprekidana linija na slici 12. B).



Slika 12. Uticaj tretmana B vitaminima na uspešnost izvođenja BW testa nakon ASK.
 A) Grafik pokazuje procenat omašaja zadnje leve noge u odnosu na ukupan broj koraka \pm SEM.
 B) Na osnovu broja omašaja kontralateralne noge životinje su dobijale odgovarajuće ocene. Na ordinati su prikazane srednje vrednosti rezultata za datu grupu \pm SEM. Ukupna ocena svih životinja u nultom danu predstavljena je isprekidanom linijom u sivoj zoni (srednja vrednost \pm SEM). * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$ vs L za dati dan testiranja, + $p < 0,05$; +++ $p < 0,005$ u odnosu na vrednosti ostvarene u prethodnom testiranju u okviru iste grupe.

Sličan trend oporavka primećen je i u LK2 grupi čija ocena postignuta 14. dana predstavlja 91% vrednosti ostvarene u svim grupama u nultom danu (Slika 12. B). Kod LK1 grupe oporavak nije bio bolji od L grupe, a bio je značajno slabiji u odnosu na LK i LK2 životinje. Srednja ocena u 14. danu dostiže 83% vrednosti postignute u nultom danu (Slika 12. B).

4.1.4. Uticaj B vitamina i ribavirina na oporavak lokomotorne koordinacije nakon ablacije senzomotorne kore

Kod grupa koje su primale kombinaciju vitamina i ribavirina (LKR) ili samo ribavirin (LR), vitamini su davani počev od 15. minuta nakon povrede jednom dnevno svaki dan, a ribavirin od 3. dana (plava strelica na slici 13.B označava dan kada je započet tretman ribavirinom).

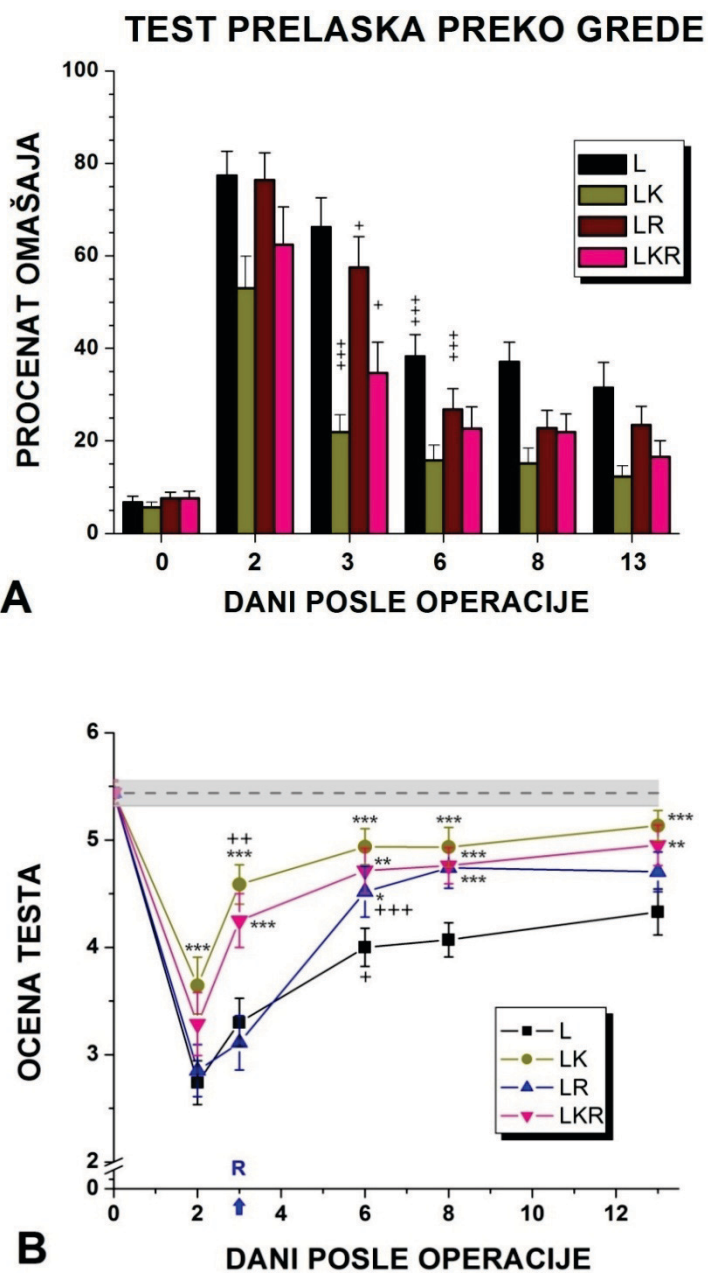
Drugog dana posle operacije uočava se znatan pad lokomotorne koordinacije, odnosno veliki procenat omašaja leve zadnje noge prilikom prelaska grede u obe ispitivane grupe, 76% omašaja u LR i 63% u LKR grupi (Slika 13.A).

Kod testiranja ovih životinja posebno je bilo interesantno videti rezultate od 6. dana, jer se eventualni efekat ribavirina mogao uočiti tek od tog posmatranog vremena. Tako je u 2. i 3. danu zabelen sličan procenat omašaja kod L i LR grupe. Međutim, od 6. dana procenat omašaja je smanjen u poređenju sa odgovarajućom vremenskom tačkom za L grupu (Slika 13. A) i to za 30% u 6. danu (* $p < 0,05$), 39% u 8. danu (** $p < 0,01$) i 26% u 13. danu. Takođe, ove životinje su ostvarile i veće ocene u odnosu na životinje iz L grupe (Slika 13. B) za 13% u 6. danu, 17% u 8. danu (* $p < 0,05$) i 9% u 13. danu.

Statistički značajno poboljšanje motorike (* $p < 0,05$) primećeno je i u LKR grupi još od prvog posmatranog dana, što je potvrđeno smanjenjem broja omašaja (Slika 13. A) i to za 24% u 2. danu, 48% u 3. danu (** $p < 0,005$), 41% u 6. danu, 41% u 8. danu i za 48% u 13. danu, kao i boljim dobijenim ocenama (Slika 13. B) za 20% u 2. danu, 29% u 3. danu (** $p < 0,005$), 18% u 6. danu, 17% u 8. danu i za 14% u 13. danu u poređenju sa L grupom.

Brzina oporavka motorne koordinacije nakon ASK u LKR grupi nije se statistički razlikovala od LK grupe. Sličan trend oporavka primećen je u obe grupe. Ocena postignuta u LKR grupi 14. dana predstavlja 91% vrednosti ostvarene u svim grupama u nultom danu (isprekidana linija) (Slika 13.B).

Kod LR grupe, posmatrano od 6. dana, brzina oporavka je bila bolja u odnosu na L grupu. Međutim, konačan skor BW testa ovih životinja u 14. danu nije bio statistički značajno bolji od onih u L grupi i predstavljao je 87% vrednosti ostvarene u nultom danu (Slika 13.B).



Slika 13. Uticaj ribavirina i B vitamina na uspešnost izvođenja BW testa nakon ASK.
 A) Grafik pokazuje procenat omašaja leve zadnje noge u odnosu na ukupan broj koraka \pm SEM.
 B) Na osnovu broja omašaja kontralateralne noge životinje su dobijale odgovarajuće ocene. Na ordinati su prikazane srednje vrednosti rezultata za datu grupu \pm SEM. Ukupna ocena svih životinja u nultom danu predstavljena je isprekidanom linijom u sivoj zoni (srednja vrednost \pm SEM). Plava strelica na apcisi na grafiku B označava dan kada je započet tretman ribavirinom * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$ vs L za dati dan testiranja, + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,005$ u odnosu na vrednosti ostvarene u prethodnom testiranju u okviru iste grupe.

4.2. UTICAJ RAZLIČITIH KOMBINACIJA B VITAMINA I RIBAVIRINA NA ODGOVOR NEURONA NAKON POVREDE MOZGA

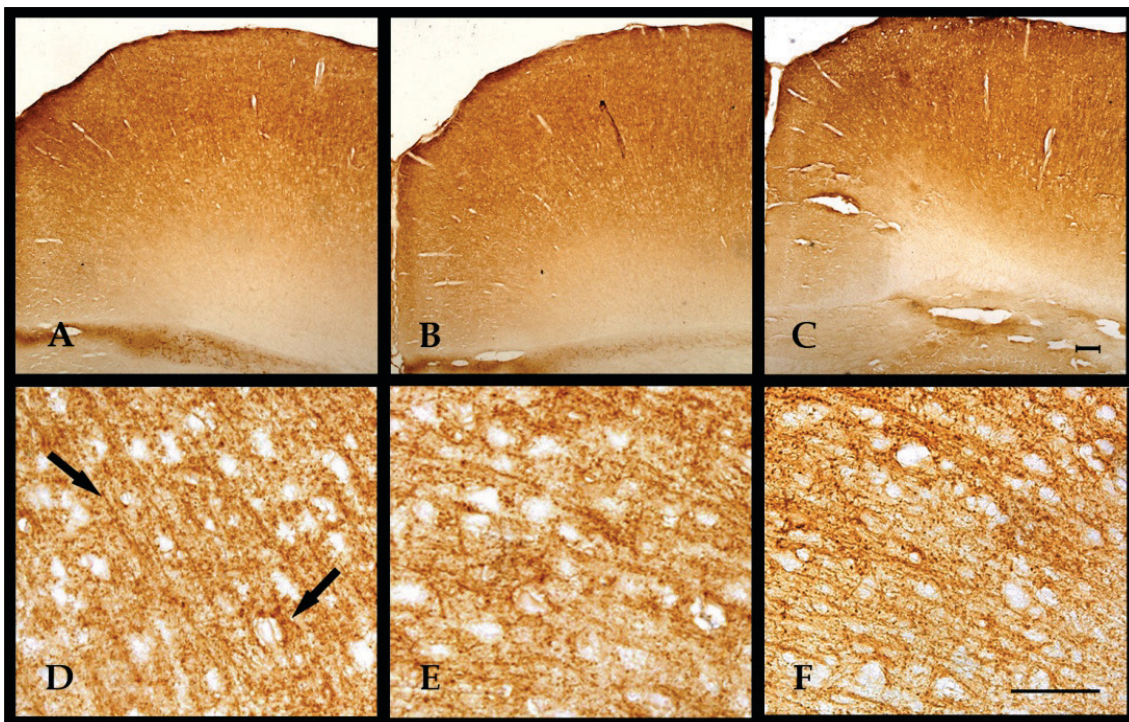
4.2.1. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na izrastanje i grananje neurita nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

4.2.1.1. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju GAP-43 proteina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Budući da je GAP-43 membranski protein visoko eksprimiran u kupi rasta aksona tokom razvića i regeneracije, kao i u presinaptičkoj membrani aksona, ekspresija GAP-43 u ovoj studiji korišćena je kao parametar za procenu plastičnosti, odnosno, regeneracije povređenog moždanog tkiva.

Ekspresija GAP- 43 proteina u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

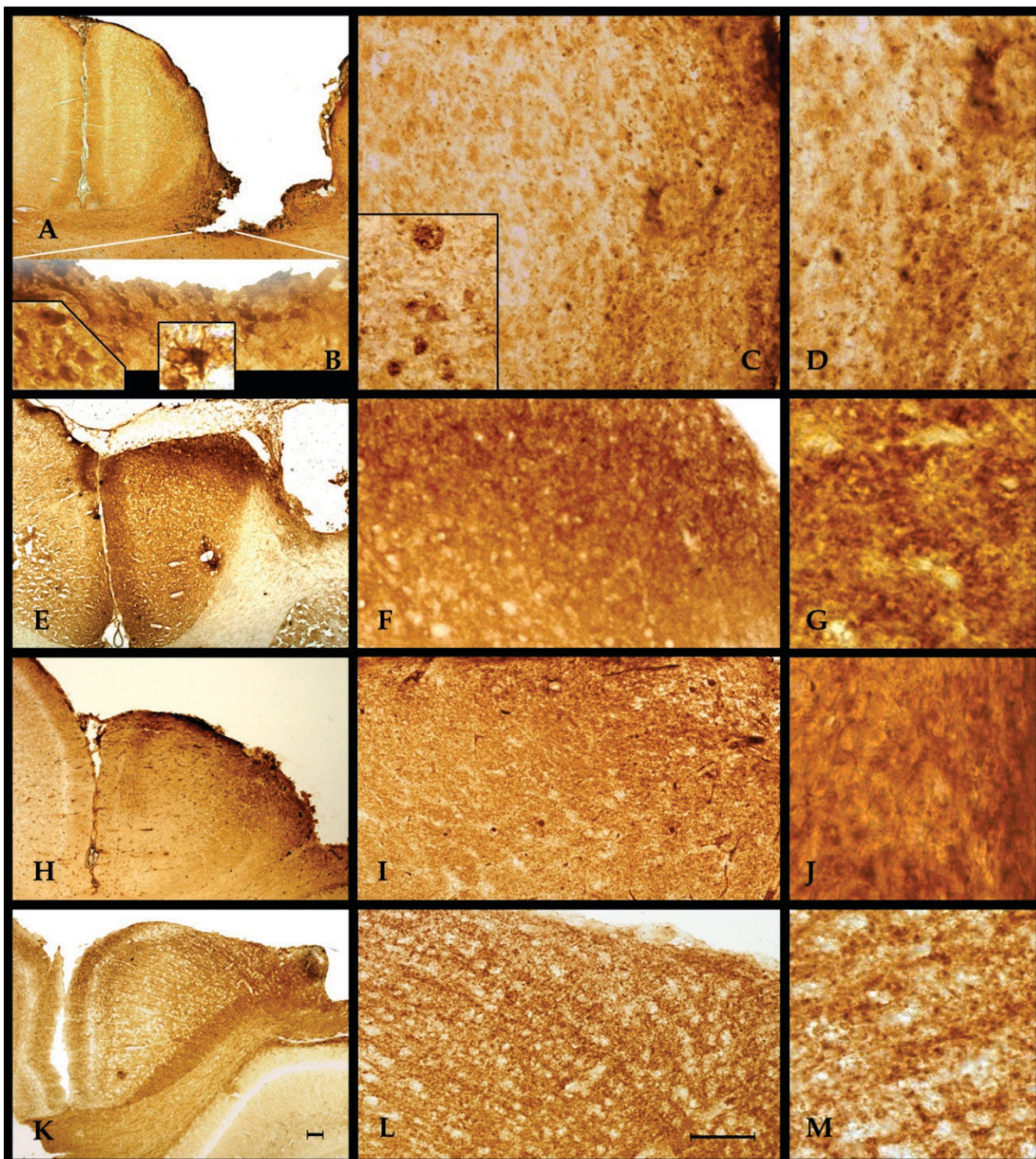
U mozgu kontrolnih intaktnih životinja (F) GAP-43 bojenje je gotovo ravnomerno raspoređeno kroz koru sa nešto intenzivnijim bojenjem u površinskim slojevima (Slika 14. A). Imunobojenje pokazuje tačkastu formu prisutnu na neuropilu sive mase (strelice na slici 14. D). Na presecima kontrolnih grupa životinja koje su primale kombinovanu terapiju B vitamina i ribavirina (FKR i SKR) nisu uočene razlike u ekspresiji GAP-43 proteina (Slika 14. B, C, E i F), na osnovu čega se može načelno zaključiti da primenjeni tretmani ne menjaju ekspresiju GAP-43 kod životinja koje nisu pretrpele leziju.



Slika 14. Imunohistohemijsko obeležavanje GAP-43 proteina u desnoj kori prednjeg mozga kontrolnih životinja. Reprezentativni koronalni preseki mozgovu F (A, D), FKR (B, E) i SKR (C, F) životinja. Skala 50 μ m.

Uticaj ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova na ekspresiju GAP-43 proteina

Na presecima mozga pacova 14. dana nakon ASK uočava se pojačana imuna reakcija u delovima kore oko mesta povrede (Slika 15. A), kao i veliki broj GAP-43 pozitivnih ćelija (Slika 15. A, B). Neke od ovih ćelija su loptasti, zadebljali intenzivno obojeni, verovatno distrofični neuroni grupisani neposredno uz ivicu lezije (levi insert na B). U istom regionu, naročito u beloj masi neposredno ispod lezije, uočavaju se i jako obojene ćelije sa jasno definisanim nastavcima koje izgledaju kao reaktivni astrociti (desni insert na B). U širem regionu oko lezije javlja se pozitivna reakcije unutar nervnih ćelija, a slabo tačkasto imunobojenje prisutno je na neuropilu sive mase (Slika 15. C, insert). U kori dalje od mesta povrede imunoreakcija je slična onoj koja se zapaža na kontralateralnoj (ne operisanoj) strani (Slika 15. A).



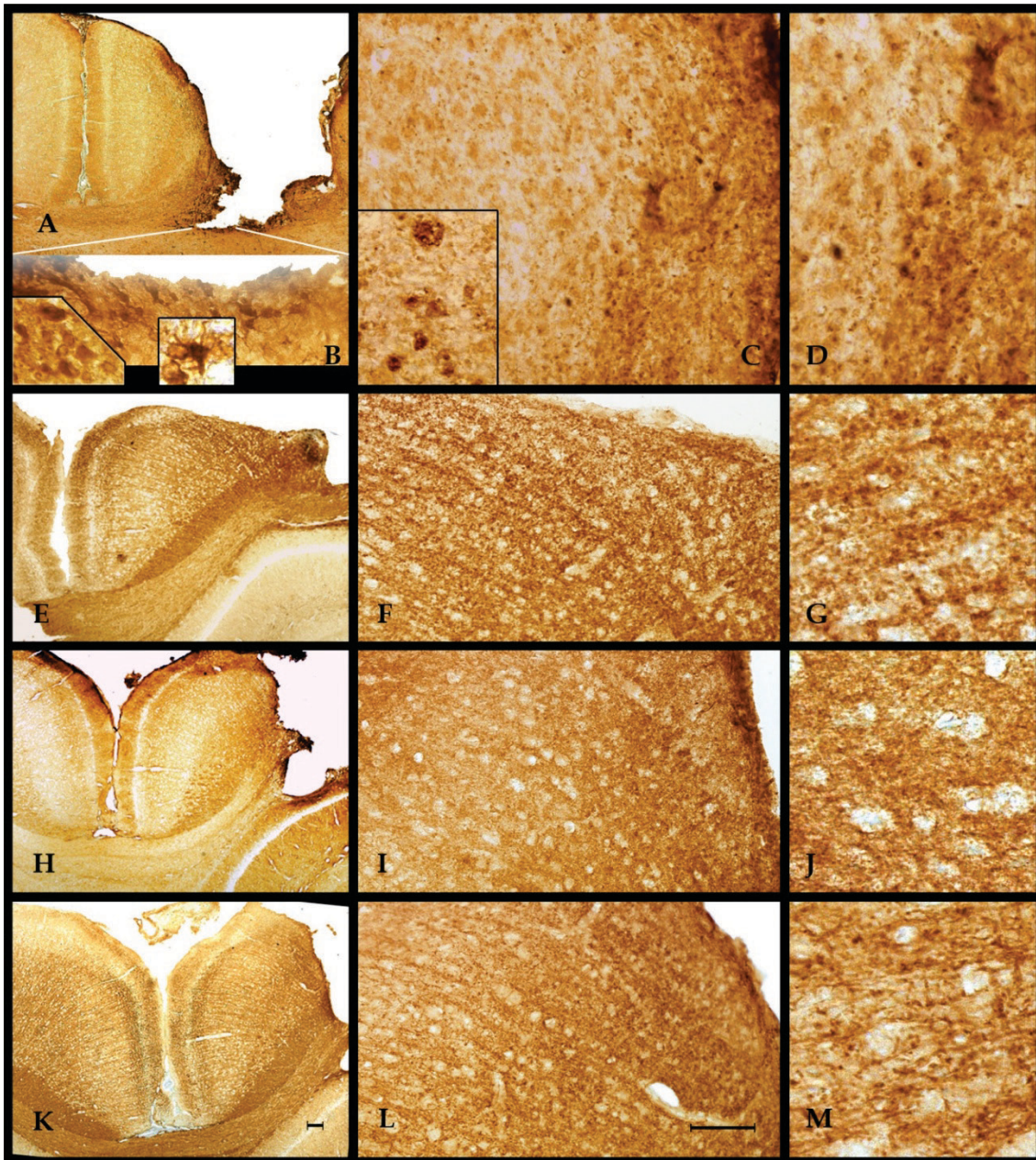
Slika 15. Imunohistohemijsko obeležavanje GAP-43 proteina nakon ASK i tretmana različitim kombinacijama B vitamina. Reprezentativni koronalni preseki mozgov L (A-D), LK1 (E-G), LK2 (H-J) i LK (K-M) životinja. D, G, J i M su uveličani segmenti sa prethodne slike. Skala 50 μ m.

Uticaoj različitih kombinacija B vitamina na ekspresiju GAP-43 proteina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Tretman vitaminima B1, B6 i B12 nakon ASK pojačava ekspresiju GAP-43 u celoj ipsilateralnoj kori kod LK1 pacova. Izrazito jaka imuna reakcija prisutna je u širem regionu oko povrede (Slika 15. E). Na većem uveličanju zapaža se da je imunoreaktivnost lokalizovana oko nervnih ćelija (Slika 15. F, G). I kod LK2 grupe uočava se intenzivnija GAP-43 reakcija u kori neposredno oko lezije (Slika 15. H). Javljaju se tamnije obojeni, distrofični neuroni, ali u manjem broju nego kod L životinja (Slika 15. A, B). Kod operisanih životinja, koje su nakon ASK primale kombinaciju svih pet B vitamina (LK) GAP-43 bojenje je veoma intenzivno u celoj kori, a naročito u prvom i šestom sloju i beloj masi uz leziju (Slika 15. K). Imunobojenje pokazuje tačkastu formu prisutnu na neuropilu sive mase (Slika 15. M) slično kao kod kontrolnih grupa (Slika 14.). Pozitivna reakcija unutar nervnih ćelija uočena je u nekoliko ćelija samo neposredno uz leziju (Slika 15.).

Uticaoj kombinacije B vitamina i ribavirina na ekspresiju GAP-43 proteina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Tretman ribavirinom nakon ASK daje zrnastu formu bojenja oko tela neurona, jače izraženu neposredno uz mesto lezije (Slika 16. H). Za razliku od L grupe (Slika 16. A-D) nije uočena imunoreaktivnost unutar ćelija (Slika 16. I, J). Kod LKR životinja koje su nakon ASK primale kombinaciju ribavirina i B vitamina opaža se slična ekspresija GAP-43 kao i kod LK grupe (Slika 16. E-G). Prisutna je intenzivna imunoreakcija posebno u gornjim slojevima kao i u šestom sloju kore obe hemisfere i u subkortikalnoj beloj masi (Slika 16. K). Reakcija je lokalizovana na neuropilu i nije bilo reakcije u telu nervnih ćelija (Slika 16. L, M).



Slika 16. Imunohistohemijsko obeležavanje GAP-43 proteina nakon ASK i tretmana različitim kombinacijama B vitamina i ribavirina. Reprerzentativni koronalni preseći mozgova L (A-D), LK (E-G), LR (H-J) i LKR (K-M) životinja. D, G, J i M su uveličani segmenti sa prethodne slike. Skala 50 μ m.

4.2.1.2. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju NF-H nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Neurofilamenti su neuron-specifični intermedijarni filamenti građeni od tri subjedinice: NF-L, NF-M i NF-H. U ovoj tezi ispitivana je ekspresija NF-H (NF200) subjedinice kod kontrolnih životinja i životinja sa ASK koje su podvrgnute različitim tretmanima.

Imunohistohemijsko obeležavanje NF-H u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

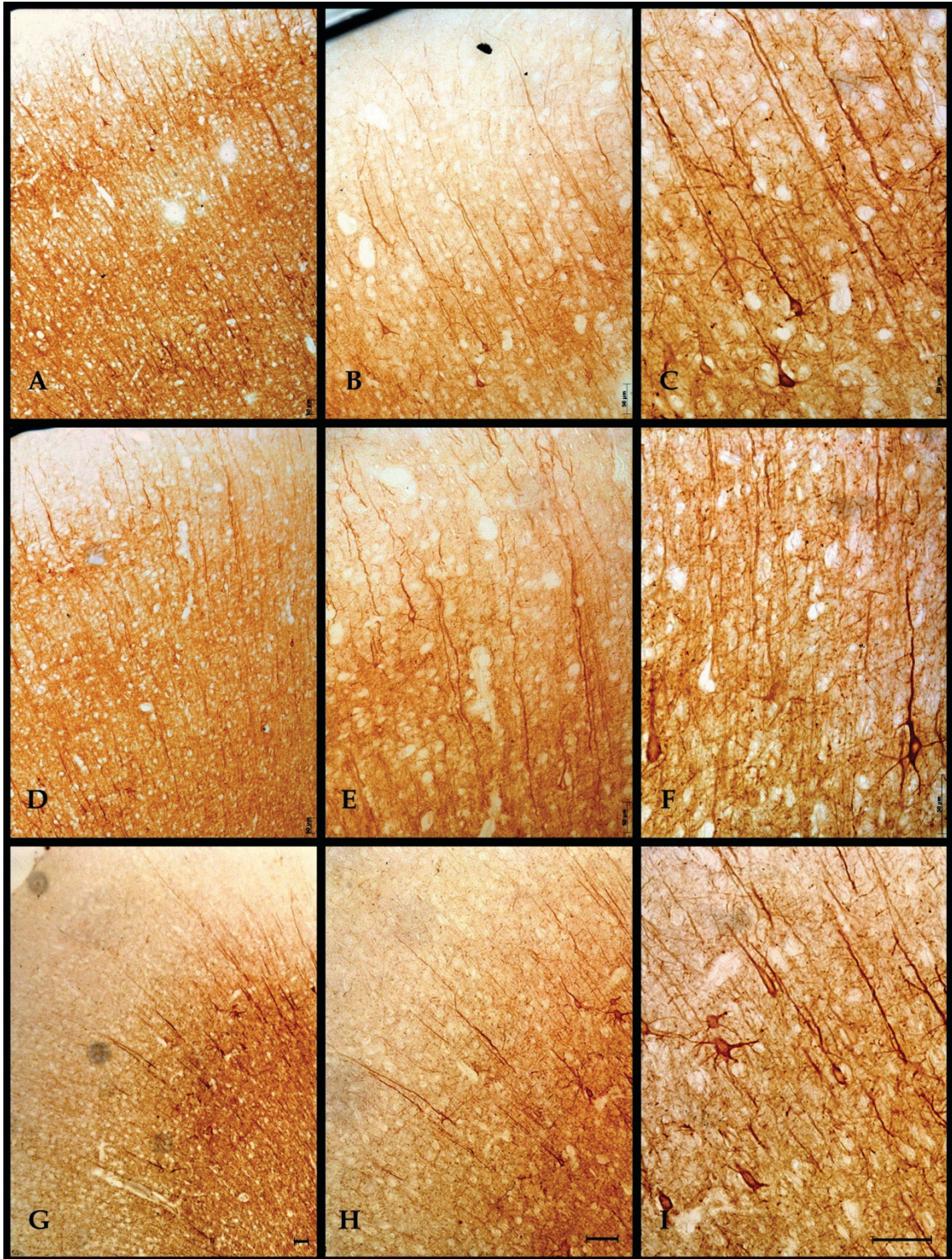
Imunohistohemijska analiza preseka mozga kontrolnih životinja (F, FKR i SKR) pokazala je da antitelo NF200 jasno boji tela neurona kao i njihove nastavke u celoj kori prednjeg mozga, naročito u III i V sloju (Slika 17.). Kao i kod proteina GAP-43, nisu uočene razlike u ekspresiji NF200 između ove tri kontrolne grupe.

Uticaj ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova na ekspresiju NF-H

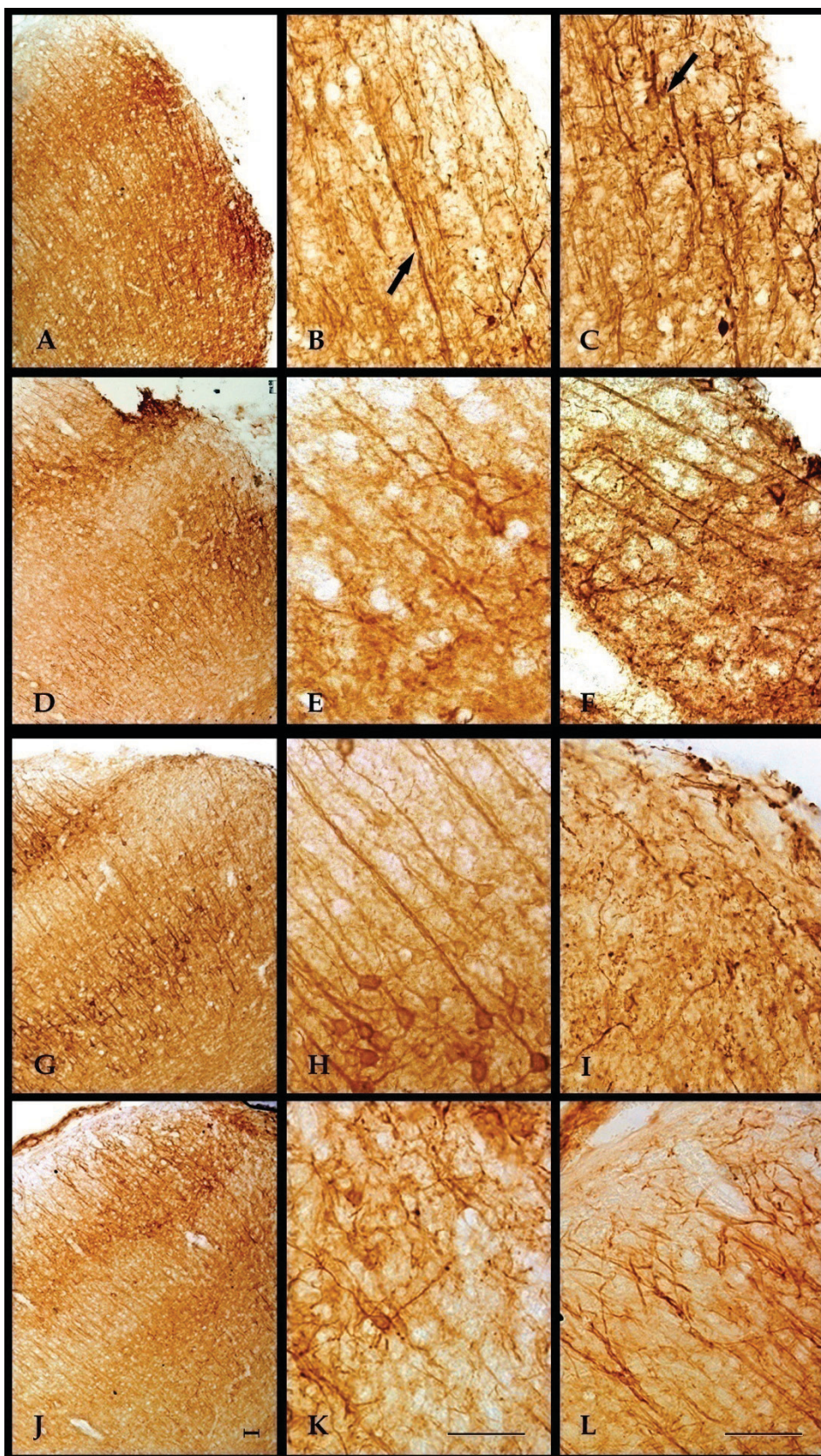
Četrnaestog dana nakon ASK ispitivani preseci mozga L grupe životinja pokazuju intenzivniju imunoreakciju oko mesta povrede gde su nagomilani deblji i isprekidani aksoni (Slika 18. B, C, strelice). U ostalim slojevima kore primetno je smanjeno bojenje ćelijskih tela neurona (Slika 18. A) u odnosu na kontrolne životinje (Slika 17.).

Uticaj tretmana različitih kombinacija B vitamina na ekspresiju NF-H nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Životinje koje su nakon ASK primale različite kombinacije B vitamina imaju manje isprekidanih aksona u oblastima neposredno uz povredu i pokazuju intenzivnije bojenje tela kortikalnih neurona u ipsilateralnoj kori (Slika 18. D-L) u odnosu na L grupu (Slika 18. A-C). Ovo je naročito izraženo u LK2 grupi gde je jaka imunoreakcija prisutna u celoj ipsilateralnoj kori (Slika 18. G), boje se tela piramidnih neurona kao i dugački, tanki aksoni (Slika 18. H).



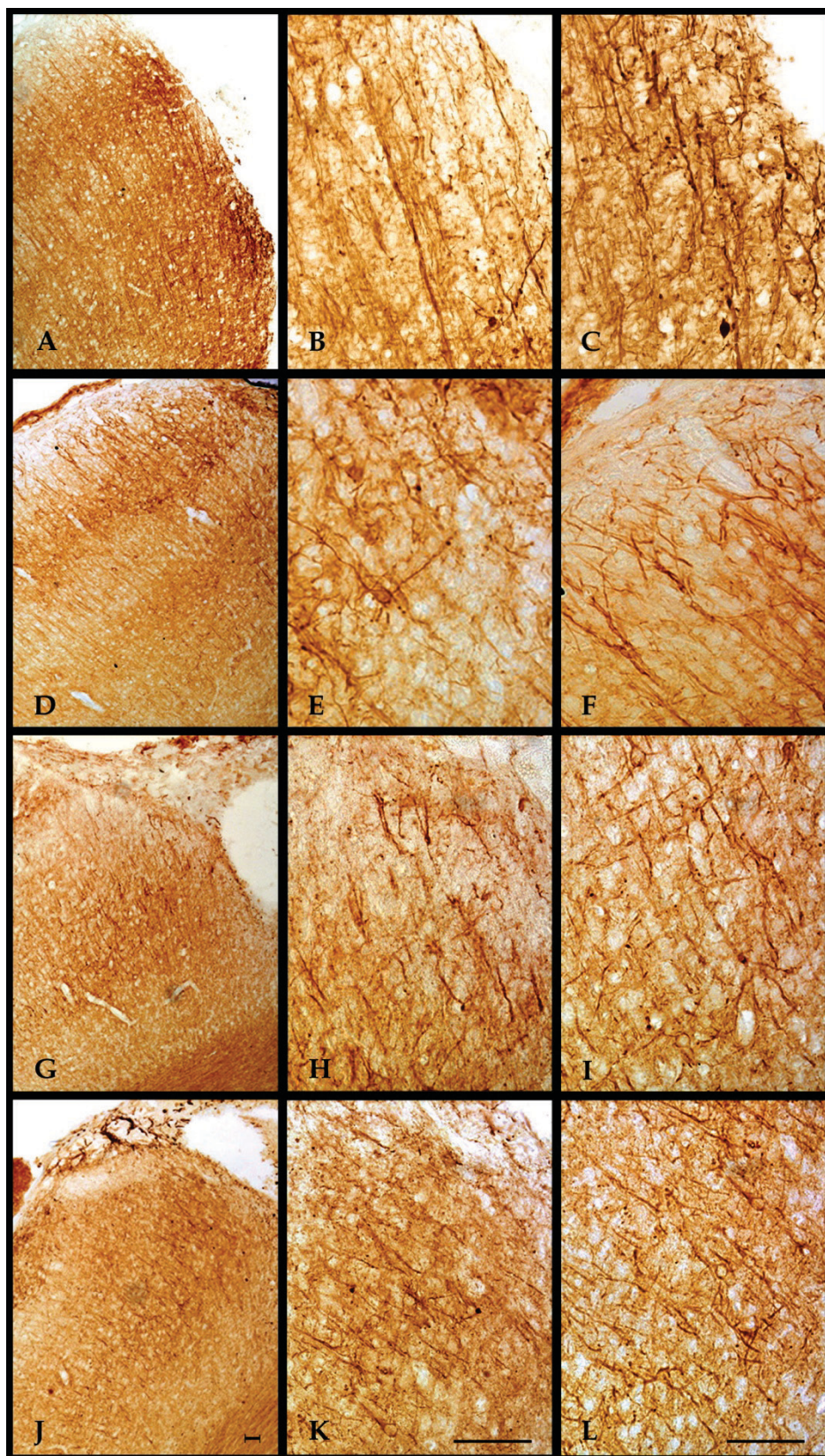
Slika 17. Imunohistohemijsko obeležavanje NF-H u desnoj kori prednjeg mozga kontrolnih životinja. Reprezentativni koronalni preseki mozgova F (A-C), FKR (D-F) i SKR (G-I) životinja. Skala 50 μ m.



Slika 18. Imunohistohemijsko obeležavanje NF-H nakon ASK i tretmana različitim kombinacijama B vitamina. Repräsentativni koronalni preseki mozga L (A-C), LK1 (D-F), LK2 (G-I) i LK (J-L) životinja. Skala 50 μ m.

Uticaj kombinacije B vitamina i ribavirina na ekspresiju NF-H nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Četrnaestog dana nakon ASK na presecima LR životinja uz samo mesto lezije uočljivi su isprekidani i razoreni aksoni, bojenje je granulisano i difuzno (Slika 19. I), primetan je gubitak pravilne organizacije aksona koja se vidi kod kontrolnih životinja (Slika 17.). Takođe, slabije se boje tela neurona, što je primećeno i kod L preseka (Slika 19. A-C). Tretman kombinacijom B vitamina i ribavirina daje rezultate koji su slični dobijenom bojenju kod LK2 grupe tretirane samo B vitaminima (Slika 19. D-F). Uočljivo je prisustvo manje isprekidanih aksona oko lezije (Slika 19. J, L) u odnosu na L grupu, ali i gubitak fine uređenosti aksona koji je vidljiv kod kontrolnih grupa. U ostatku kore boje se tela neurona kao i njihovi nastavci (Slika 19. K).



Slika 19. Imunohistohemijsko obeležavanje NF-H nakon ASK i tretmana različitim kombinacijama B vitamina i ribavirina. Repräsentativni koronalni preseki mozgov L (A-C), LK (D-F), LR (G-I) i LKR (J-L) životinja. Skala 50 μ m.

4.2.1.3. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju MAP2 proteina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

MAP2 su klasa proteina asociiranih sa mikrotubulama. Važni su za stabilnost mikrotubula i plastičnost neurona. Specifično se eksprimiraju u dendritima, pa se imunohistohemijsko bojenje na MAP2 rutinski koristi kao marker vizualizacije dendrita.

Ekspresija MAP2 proteina u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

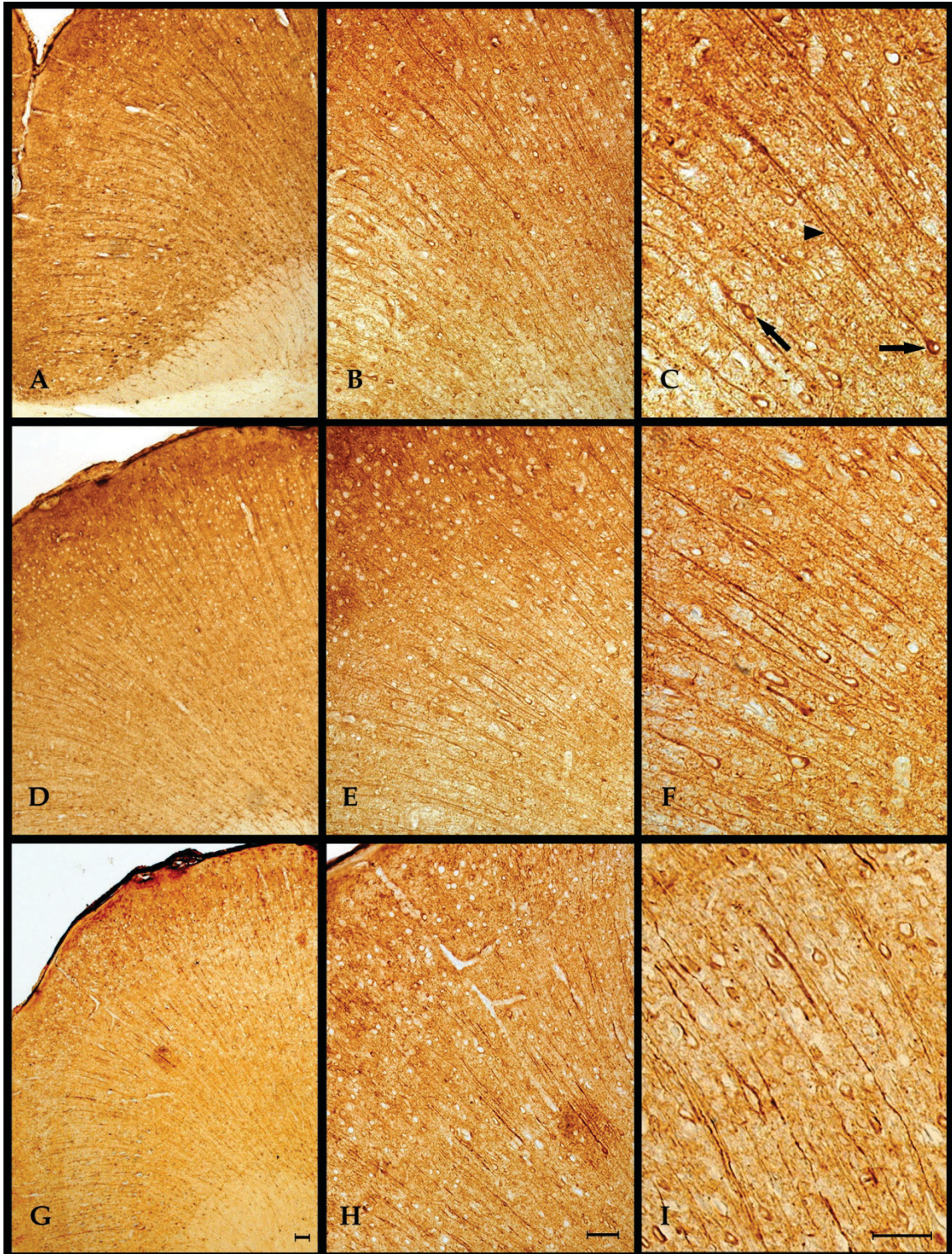
Analiza preseka mozga kontrolnih životinja (F) (Slika 20. A-C) pokazala je da je MAP2 imunoreakcija lokalizovana na telu neurona (Slika 20. C, strelice), kao i u debelim proksimalim dendritima (Slika 20. C, vrh strelice) u celoj kori prednjeg mozga. Sličnost dobijenih rezultata u kontrolnim grupama FKR i SKR (Slika 20. D-J) ukazuje da tretman kombinacijom B vitamina i ribavirina ne utiče na ekspresiju ovog citoskeletnog proteina u odsustvu lezije.

Uticaj ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova na ekspresiju MAP2 proteina

Nakon ASK na presecima mozga inkubiranih sa MAP2 antitelom imuna reakcija je intenzivna u delu kore neposredno uz mesto lezije (Slika 21. A). Uočljivi su zrnasto obojeni isprekidani nastavci (Slika 21. B, vrh strelice) i samo mali broj obojenih tela neurona (Slika 21. C, strelica) u odnosu na kontrole (Slika 20.).

Uticaj različitih kombinacija B vitamina na ekspresiju MAP2 proteina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Rezultati dobijeni nakon tretmana B vitaminima donekle su se razlikovali u zavisnosti od primenjene kombinacije B vitamina. Analizom preparata LK1 životinja (Slika 21. D-F) uočena je slična ekspresija MAP2 proteina kao kod kontrolnih grupa (Slika 20.). Vide se periferno obojena tela neurona u ipsilateralnoj kori (Slika 21. D, E, strelica), ali zrnastija forma bojenja dendrita (Slika 21. F, vrh strelice).



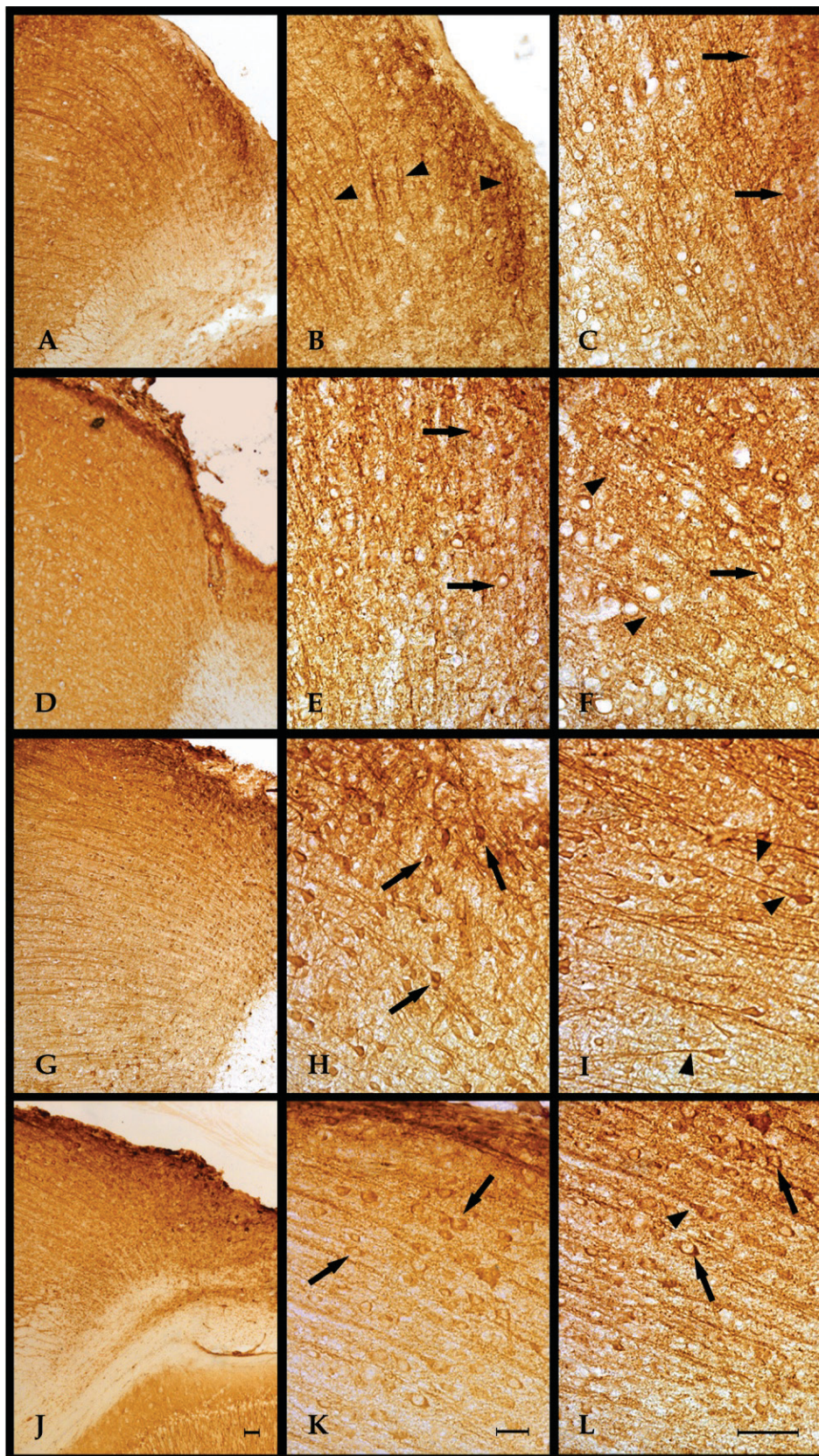
Slika 20. Imunohistohemijsko obeležavanje MAP2 proteina u desnoj kori prednjeg mozga kontrolnih životinja. Reprezentativni koronalni preseki mozga F (A-C), FKR (D-F) i SKR (G-I) životinja. Skala 50 μ m.

Povećanje MAP2 imunoreaktivnosti uočava se samo u uskom delu oko mesta lezije (Slika 21. D). Imunoreakcija je najizraženija kod LK2 grupe. Veliki broj MAP2 pozitivnih ćelija i jasno obojeni dendriti uočljivi su u celoj ipsilateralnoj kori (Slika 21. G). Na većem uveličanju, čak i uz samu leziju, jasno se vide obojena tela neurona (Slika 21. H, strelica) i njihovi dendriti (Slika 21. I, vrh strelice).

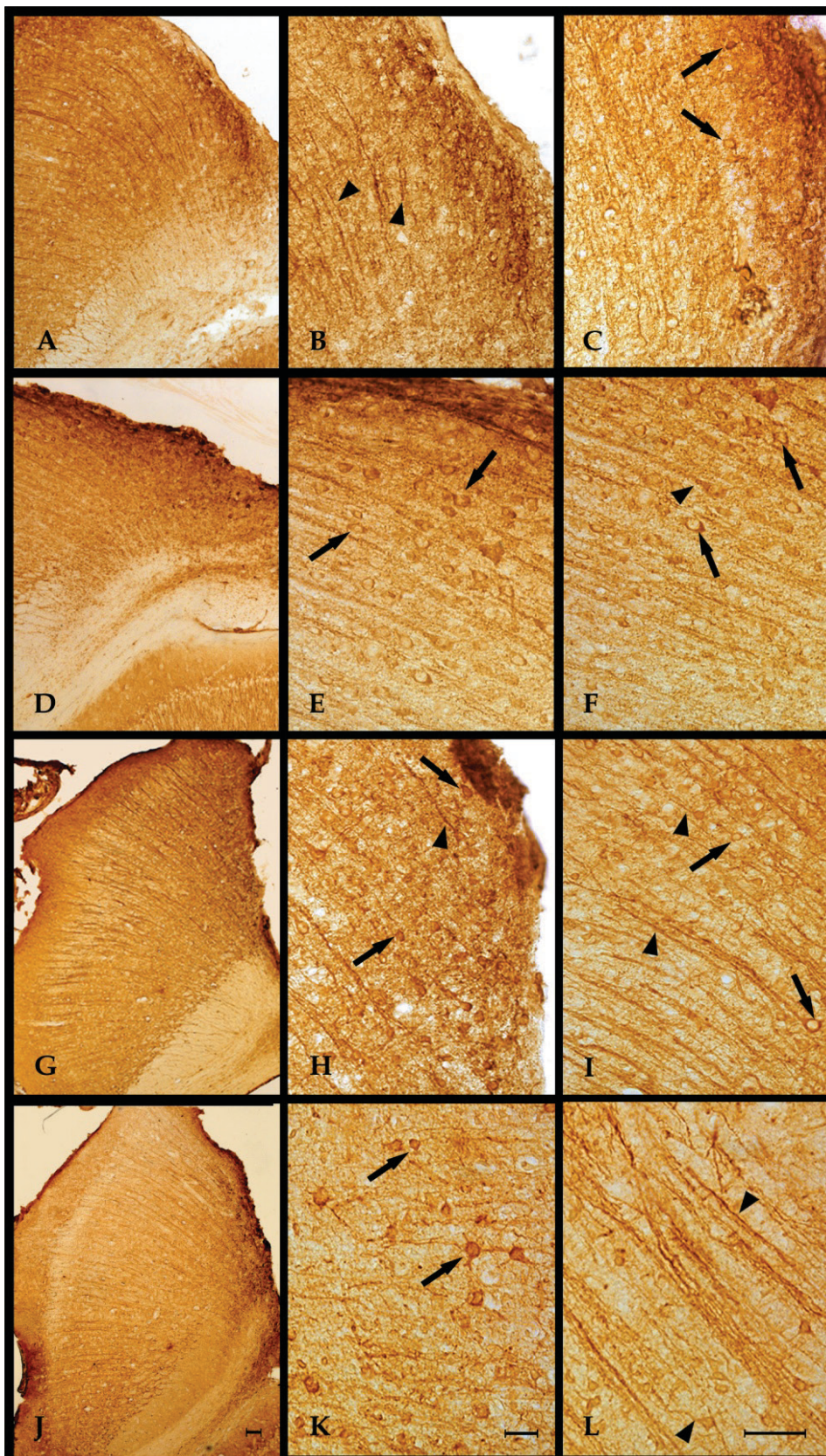
Na presecima mozga LK životinja takođe su uočljivi neuroni u celoj ipsilateralnoj kori (Slika 21. J), MAP2 imunobojenje je lokalizovano na periferiji ćelijskog tela (Slika 21. K, L, strelice) i u dendritima (Slika 21. K, L, vrh strelice) .

Uticaj kombinacije B vitamina i ribavirina na ekspresiju MAP2 proteina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Kod LR i LKR grupa tretmani ribavirinom, odnosno kombinacijom B vitamina i ribavirina imali su efekta na ekspresiju MAP2 proteina nakon ASK. Rezultati imunobojenja u LR grupi (Slika 22. G-I) slični su onima dobijenim kod LK životinja (Slika 22. D-F). Veliki broj ćelija i njihovih proksimalnih dendrita intenzivno su obojeni u celoj ipsilateralnoj kori (Slika 22. G). Čak i uz samu leziju, jasno se vide obojena tela neurona (Slika 22. H, I, strelica) i njihovi dendriti (Slika 22. H, I, vrh strelice). I na presecima mozga LKR grupe uočava se MAP2 imunobojenje lokalizovano na telu neurona (Slika 22. K, strelice) i njihovim nastavcima (Slika 22. I, vrh strelice.).



Slika 21. Imunohistohemijsko obeležavanje MAP2 proteina nakon ASK i tretmana različitim kombinacijama B vitamina. Reprezentativni koronalni preseki mozгова L (A-C), LK1 (D-F), LK2 (G-I) i LK (J-L) životinja. Skala 50 μ m.



Slika 22. Imunohistohemijsko obeležavanje MAP2 proteina nakon ASK i tretmana različitim kombinacijama B vitamina i ribavirina. Reprerzentativni koronalni preseki mozgova L (A-C), LK (D-F), LR (G-I) i LKR (J-L) životinja. Skala 50 μ m

4.2.2. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju markera sinaptogeneze

4.2.2.1. Ekspresija sinaptofizina u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

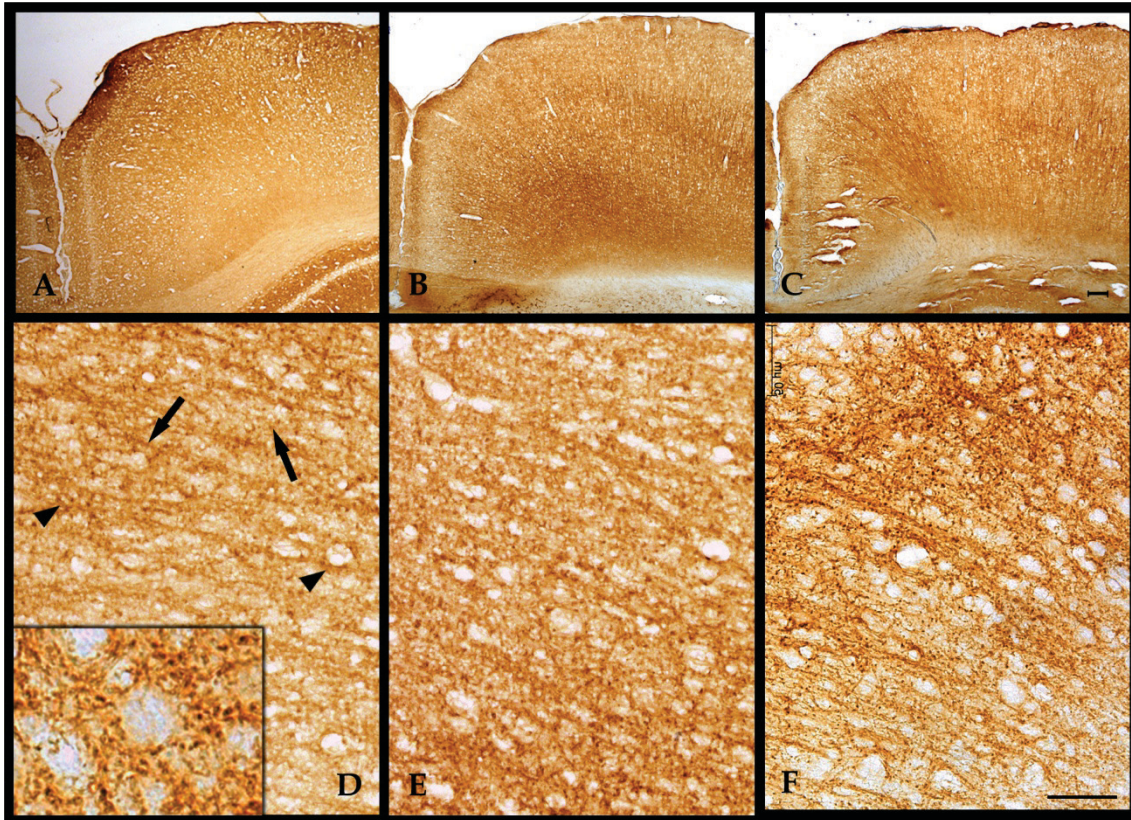
S obzirom na to da je sinaptofizin sastavni glikoprotein sinaptičkih vezikula i marker presinaptičke oblasti neurona, ekspresija sinaptofizina u ovoj studiji korišćena je za praćenje formiranja novih sinapsi.

Ekspresija sinaptofizina u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

Na presecima mozga intaktnih kontrolnih životinja (F grupa) imunoreakcija je gotovo ravnomerno raspoređena kroz koru, dok u subkortikalnoj beloj masi imunoreaktivnost na sinaptofizin nije primećena (Slika 23. A). Na većem uveličanju (Slika 23. D) vidljivo je difuzno, zrnasto bojenje između neurona (strelica) kao i zrnaste nakupine oko tela neurona (vrh strelice). Kod kontrolnih grupa koje su tretirane B vitaminima i ribavirinom (FKR i SKR) nije uočena razlika u imunoreakciji na sinaptofizin u desnoj kori prednjeg mozga (Slika 23. B, C, E, F) u odnosu na F kontrolnu grupu. Dobijeni rezultati pokazuju da tretman ribavirinom i B vitaminima ne utiče na ekspresiju sinaptofizina u odsustvu povrede.

Uticaj ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova na ekspresiju sinaptofizina

Na presecima mozga 14. dana nakon ASK dolazi do pojačanog bojenja na sinaptofizin u delu kore oko mesta lezije (Slika 24. A). U ostalim regionima kore i u subkortikalnoj beloj masi intenzitet imunoreakcije je isti kao kod F kontrolne grupe (Slika 23. A, C). Na većem uveličanju (Slika 24. C), duž oboda lezije, uočava se intenzivno granularno bojenje između neurona (strelice), oko tela neurona (vrh strelice) i u telima degenerisanih neurona .



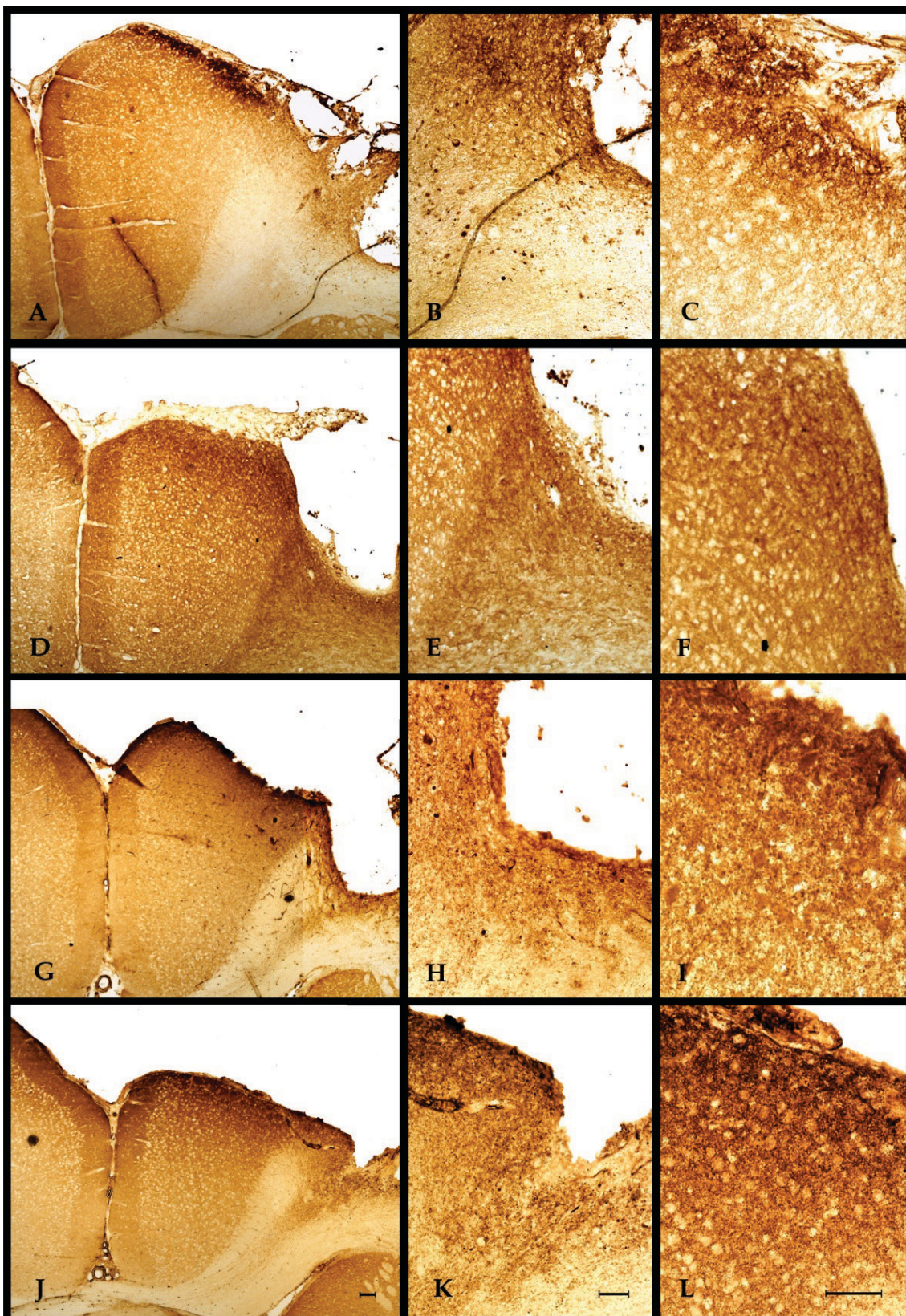
Slika 23. Imunohistohemijsko obeležavanje sinaptofizina u desnoj kori prednjeg mozga kontrolnih životinja. Reprezentativni koronalni preseki mozгова F (A, D), FKR (B, E) i SKR (C, E) životinja. Skala 50 μ m.

Uticaj različitih kombinacija B vitamina na ekspresiju sinaptofizina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

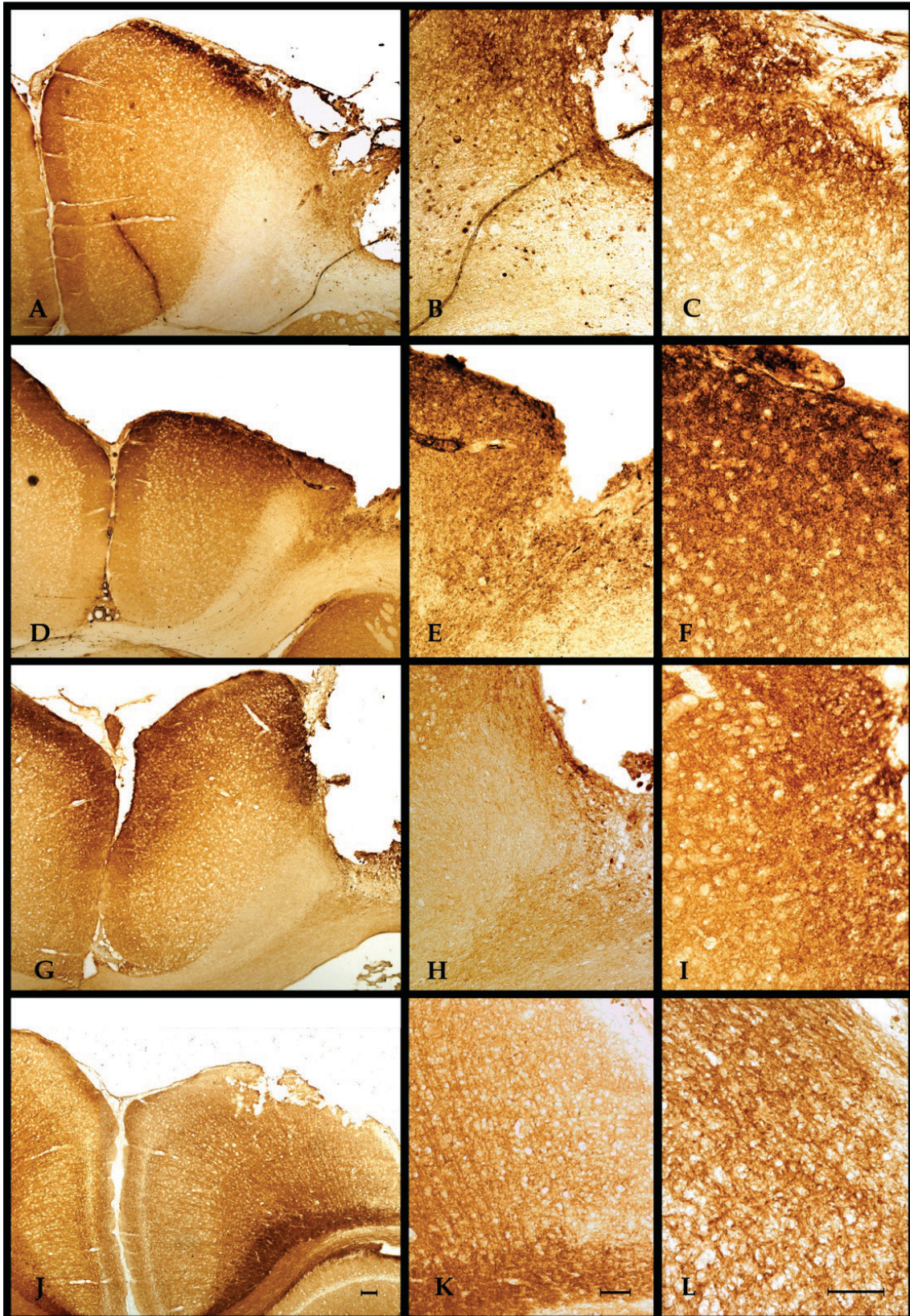
Kod preseka mozga životinja iz grupe LK1 uočena je intenzivna imunoreaktivnost u delu oko povrede (Slika 24. D-F), kako u kortikalnim zonama (Slika 24. F) tako i u subkortikalnoj beloj masi (Slika 24. D, E). Povećana ekspresija sinaptofizina zahvata značajno širi region kore u odnosu na L grupu i uočava se u većem delu kore, a posebno u subkortikalnoj beloj masi ispod mesta lezije. Nakon tretmana operisanih životinja kombinacijom B2 i B3 vitamina (LK2) imunoreaktivnost je bila nešto slabija nego kod LK1 grupe (Slika 24. G-I), i ekspresija sinaptofizina se ne zapaža u subkortikalnoj beloj masi. Kod LK grupe (Slika 24. J-L) zapaža se sličan način ekspresije sinaptofizina kao kod LK2, ali je ekspresija sinaptofizina više povećana i u širem delu kore oko mesta povrede (Slika 24. L). Na slici 24. L vidljivo je intenzivno, zrnasto bojenje između neurona (strelica), kao i zrnaste akumulacije oko tela neurona.

Uticaj kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju sinaptofizina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Nakon tretmana ribavirinom intenzitet obojenosti je nešto slabiji nego u L i LK grupi, ali povećana ekspresija sinaptofizina uočava se u većem delu ipsilateralne, ali i kontralateralne kore (Slika 25. G). U subkortikalnoj beloј masi imunoreaktivnost na sinaptofizin nije primećena (Slika 25. G, H). Pojaćana ekspresija sinaptofizina u ipsilateralnoj kori uočena je i kod preseka mozga LKR životinja, kod kojih je intenzivna imunoreaktivnost uočena u šestom sloju kore, a naroćito u subkortikalnoj beloј masi. Zapaćaju se izuteno dobro obojeni snopovi neurona koji polaze od subkortikalne bele mase ka pialnoj površini (Slika 25. J, K). Ovo povećanje ekspresije sinaptofizina uočava se i na kontralateralnoj strani (Slika 25. J).



Slika 24. Imunohistohemijsko obeležavanje sinaptofizina nakon ASK i tretmana različitim kombinacijama B vitamina. Reprezentativni koronalni preseki mozga L (A-C), LK1 (D-F), LK2 (G-I) i LK (J-L) životinja. Skala 50 μ m.



Slika 25. Imunohistohemijsko obeležavanje sinaptofizina nakon ASK i tretmana različitim kombinacijama B vitamina i ribavirina. Reprerzentativni koronalni preseki mozгова L (A-C), LK (D-F), LR (G-I) i LKR (J-L) životinja. Skala 50 μm .

4.2.3. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na neurodegeneraciju

4.2.3.1. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na imunohistohemijsko obeležavanje neurofilamenata SMI 31 antitelom nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

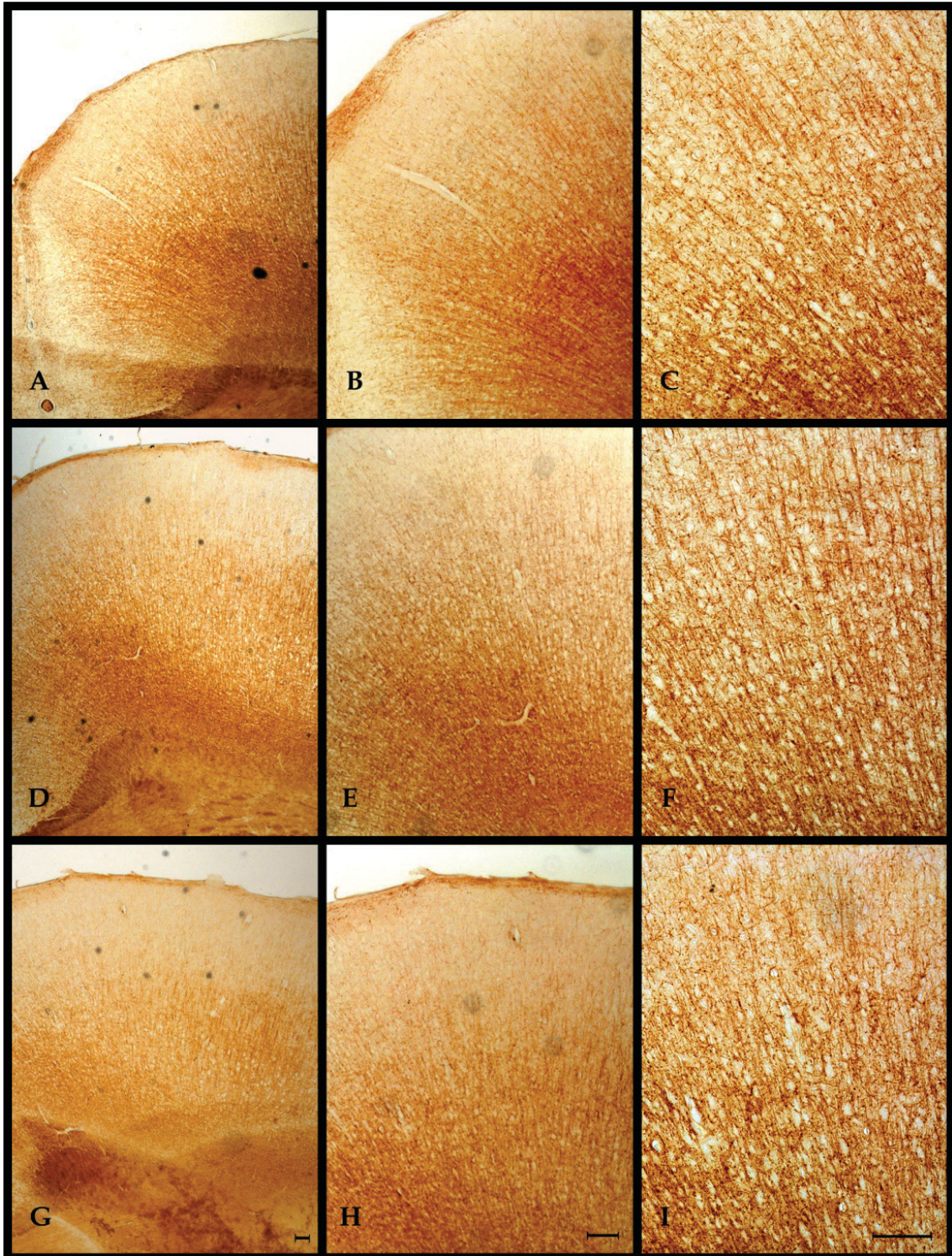
SMI 31 antitelo specifično prepoznaje fosforilisane epitope NF-H subjedinice neurofilamenata, a u manjoj meri i fosforilisane epitope NF-M subjedinice. Budući da se fosforilacija i integracija NF subjedinica u funkcionalne neurofilamente odvija u aksonima, u fiziološkim uslovima se imunoreaktivnost na SMI 31 antitelo uočava isključivo na tankim i debelim aksonima i gotovo nikad na telima neurona. Pojačano imunobojenje sa SMI 31 antitelom ukazuje na neurodegeneraciju.

Imunohistohemijsko obeležavanje neurofilamenata SMI 31 antitelom u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

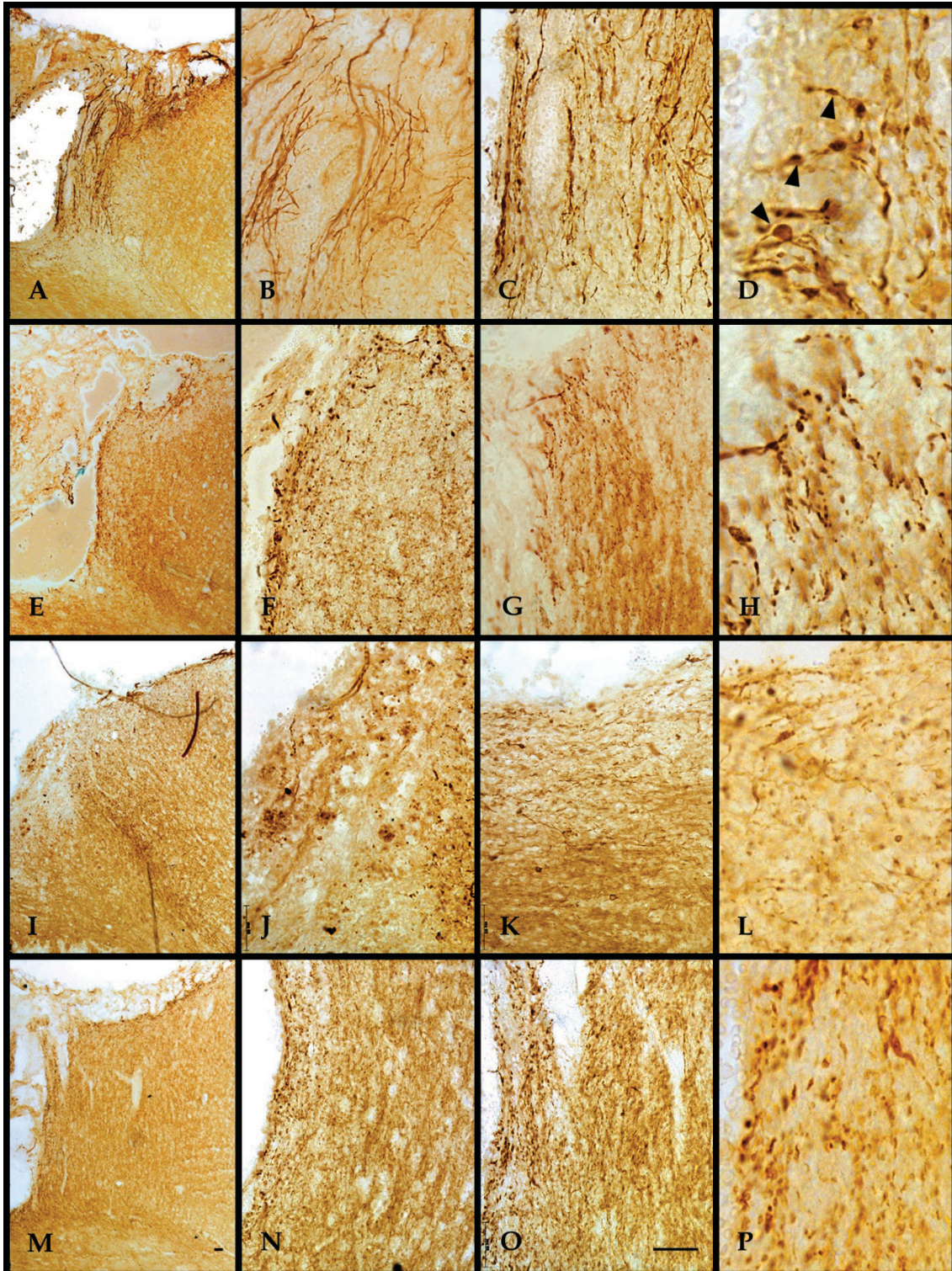
Na presecima mozga dobijenim od kontrolnih životinja F, FKR i SKR, uočava se široka rasprostranjenost fosforilisanih aksona obeleženih SMI 31 antitelom, ali se zapaža i izostanak bojenja tela neurona (Slika 26.). Nema razlike u dobijenim rezultatima među kontrolnim grupama, korišćeni tretman kombinacijom B vitamina i ribavirina ne menja obrazac fosforilacije NF u odsustvu lezije.

Imunohistohemijsko obeležavanje neurofilamenata SMI 31 antitelom nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Četrnaestog dana nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova uočljiva je hiperfosforilacija NF u širokom pojasu oko mesta povrede (Slika 27. A). Na većem uveličanju intenzivna imunoreakcija otkriva zadebljala i isprekidana nervna vlakna, kao i tamnije obojene okrugle, perlaste strukture (Slika 27. B, C) za koje je na uveličanom segmentu pokazano da su loptasta proširenja na distrofičnim aksonima (Slika 27. D, vrh strelice).



Slika 26. Imunohistohemijsko obeležavanje neurofilamenata SMI 31 antitelom u desnoj kori prednjeg mozga kontrolnih životinja. Reprezentativni koronalni preseki mozgovna F (A-C), FKR (D-F) i SKR (G-I) životinja. Skala 50 μ m.



Slika 27. Imunohistohemijsko obeležavanje neurofilamenata SMI 31 antitelom 14. dana nakon ASK i tretmana različitim kombinacijama B vitamina. Reprerzentativni koronalni preseki mozgov L (A- D), LK1 (E-H), LK2 (I-L) i LK (M-P) životinja. D, H, L i P su uveličani segmenti sa prethodne slike. Skala 50 μ m.

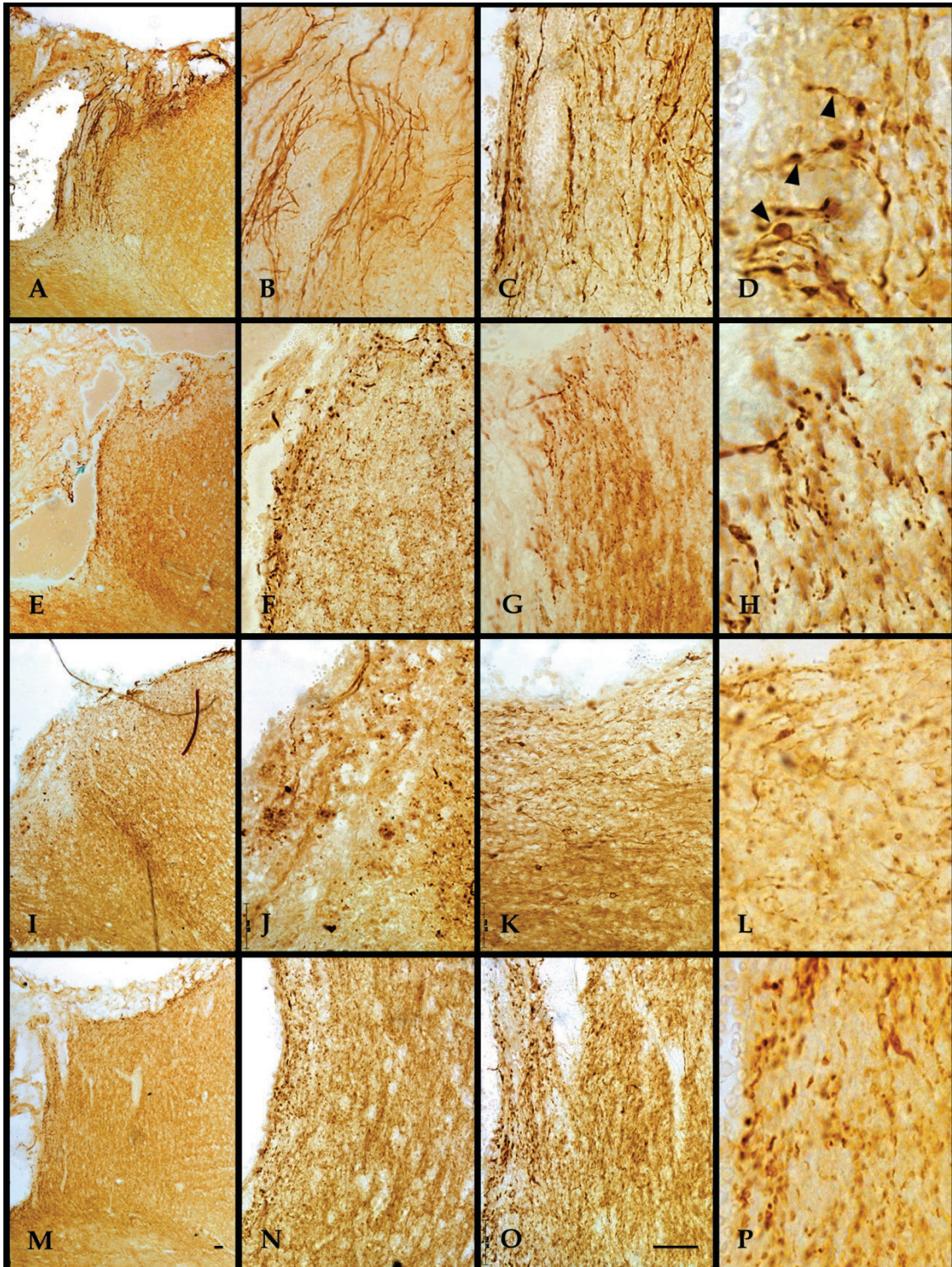
Uticaj različitih kombinacija B vitamina na imunohistohemijsko obeležavanje neurofilamenata SMI 31 antitelom nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Za razliku od L grupe, na presecima mozga životinja koje su nakon ASK primale različite kombinacije B vitamina (LK1, LK2, LK), posle bojenja SMI 31 antitelom nisu uočena intenzivno obojena isprekidana nervna vlakna. Samo se u uskom regionu, neposredno uz leziju vide tamno obojene zrnaste strukture ostaci isprekidanih neurona, kao i neurona u Valerovoj degeneraciji (Slika 27. E-G, I-K, M-O), dok je u ostatku kore imunobojenje slično onom kod kontrolnih životinja (Slika 26.). Sve tri kombinacije smanjuju „perlanje neurona“ koje je pokazatelj procesa neurodegeneracije i to sa sledećom efikasnošću $LK2 > LK \geq LK1$ (Slika 27. P, L, H).

Uticaj kombinacija B vitamina i ribavirina na imunohistohemijsko obeležavanje neurofilamenata SMI 31 antitelom nakon ablacije senzomotorne kore

prednjeg mozga pacova

Nasuprot intenzivnoj hiperfosforilaciji NF u delu kore oko mesta povrede prisutne kod L životinja (Slika 28. A-D), imunobojenje za SMI 31 kod LR i LKR grupa je difuzno i slično reakciji dobijenoj kod LK životinja (Slika 28. E-H). Perlaste strukture i difuzno obojeni tanki aksoni (Slika 28. I-K, M-O), kao i tamnije obojena, loptasta proširenja neurita (Slika 28. L, P), uočavaju se samo neposredno uz mesto lezije.

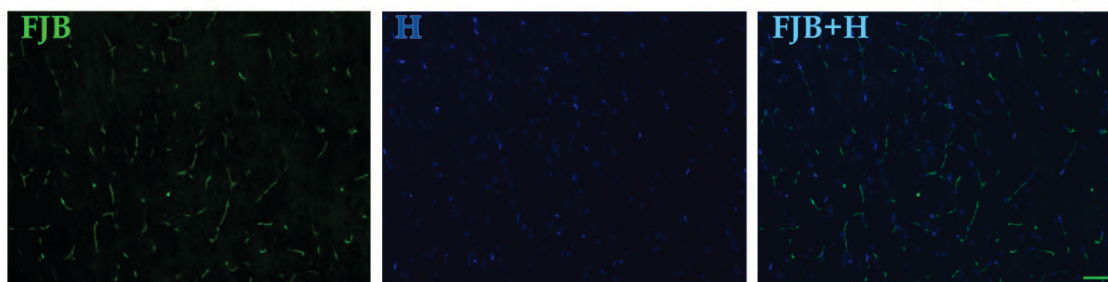


Slika 28. Imunohistohemijsko obeležavanje neurofilamenata antitelom SMI 31 nakon ASK i tretmana različitim kombinacijama B vitamina i ribavirina. Reprezentativni koronalni preseći mozga L (A-D), LK (E-H), LR (I-L) i LKR (M-P) životinja. Skala 50 μ m.

4.2.3.2. Histochemijsko bojenje fluoro-žadom B

Fluoro-žad B (FJB) je poznat kao fluorescentni marker sa visokim afinitetom za obeležavanje degenerisanih neurona.

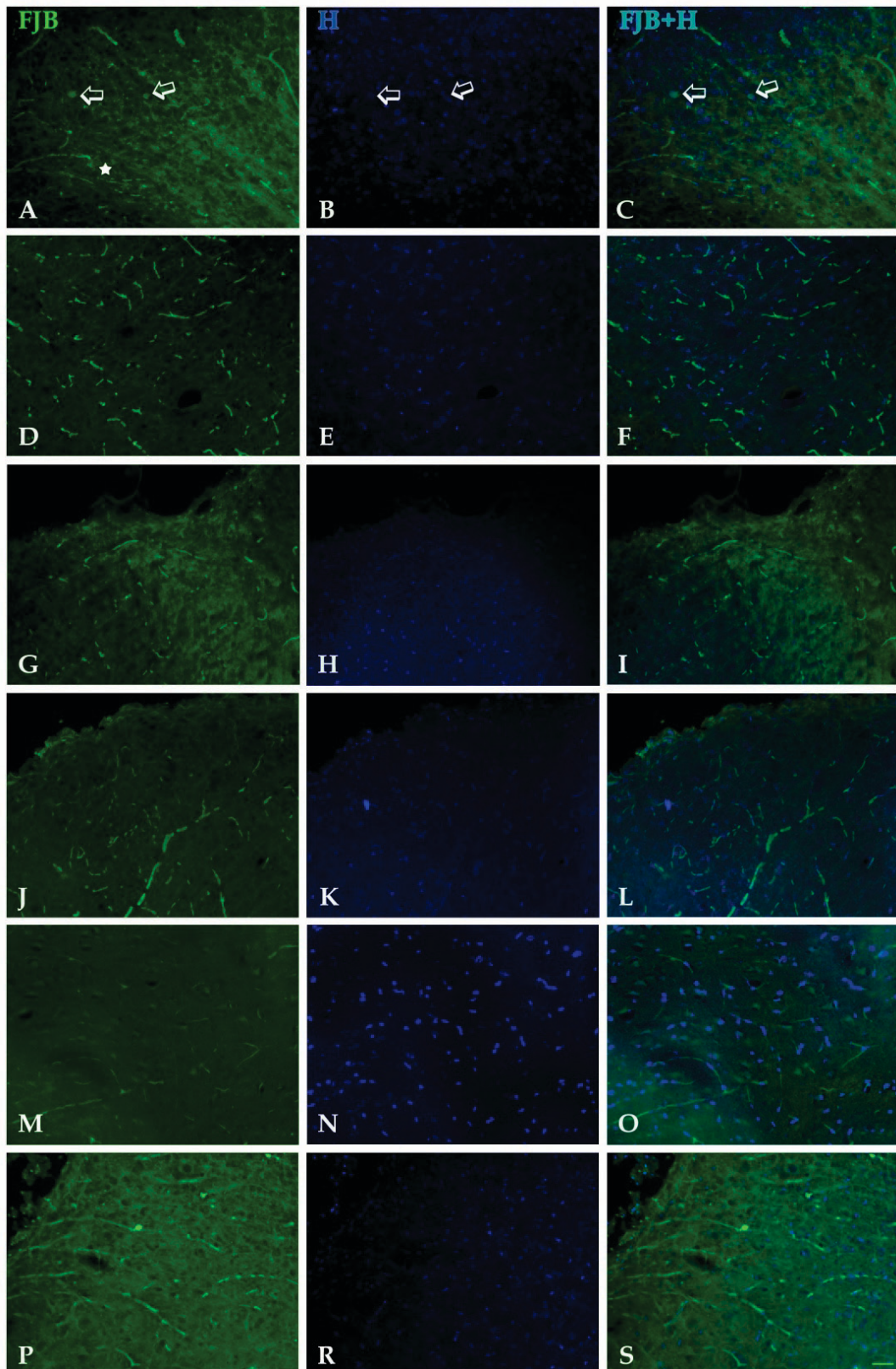
Na presecima intaktnih životinja nisu uočene FJB obojene ćelije u kori prednjeg mozga (Slika 29.). Takođe, ni kod lažno operisanih i intaktnih životinja tretiranih kombinacijom B vitaminima i ribavirina nisu pronađeni obojeni bilo degenerisani ili normalni neuroni (podaci nisu prikazani).



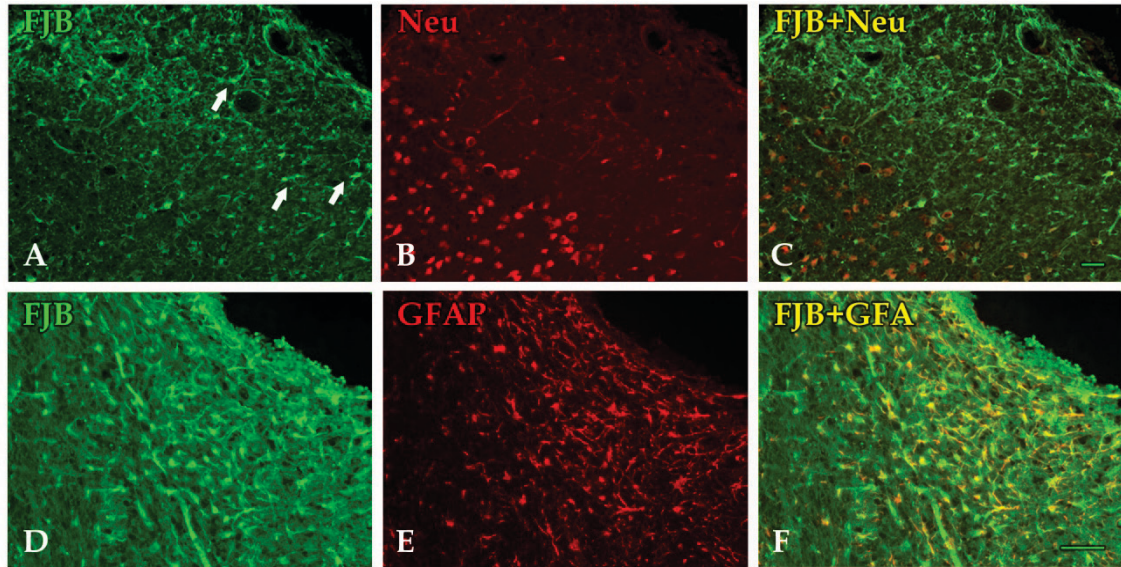
Slika 29. Dvojno imunofluorescentno bojenje kore prednjeg mozga kontrolnih životinja sa FJB. Reprezentativni koronalni presek mozga F životinja. FJB bojenje (FJB) (zeleno), Hočchst bojenje (H) (plavo) i preklopljena slika (FJB+H). Skala 50 μ m.

U 14. danu nakon ASK pronađene su FJB pozitivne ćelije samo u L grupi (Slika 30. A-C, strelice). Na preparatima izolovanim iz životinja koje su nakon ASK tretirane B vitaminima ili kombinacijom B vitamina i ribavirina nije bilo pozitivnog bojenja, uglavnom su se bojili krvni sudovi (Slika 30. D-R, zvezdica).

Na nekim presecima životinja L grupe uočene su FJB pozitivne zvezdaste ćelije u oblastima kore neposredno uz povredu (Slika 31. A, strelice). Dvojnim bojenjem sa GFAP proteinom koji je specifičan marker astrocita (Slika 31. E), pokazano je da su ove zvezdaste ćelije, koje su FJB⁺/GFAP⁺, reaktivni astrociti (Slika 31. F). Dvojnim bojenjem FJB sa NeuN, koji boji tela neurona, pokazano je da se neuroni nalaze u širem obodu oko lezije, dok ih uz samo mesto lezije nema (Slika 31. B).



Slika 30. Dvojno imunofluorescentno bojenje kore prednjeg mozga FJB nakon ASK i tretmana različitim kombinacijama B vitamina i ribavirina. Reprezentativni koronalni preseki mozgova L (A-C), LK1 (D-F), LK2 (G-I), LK (J-L), LR (M-O) i LKR (P-S) životinja. Fluoro-žad B bojenje (FJB) (zeleno), Hočst bojenje (H) (plavo) i preklopljena slika (FJB+H). Skala 50 μ m.



Slika 31. Dvojno bojenje prednjeg mozga pacova fluoro-žadom (*zeleno*) sa NeuN (A-C) (*crveno*) ili GFAP (*crveno*) proteinom (D-F) 14. dana nakon ASK. Skala 50 μ m.

4.3. UTICAJ RAZLIČITIH KOMBINACIJA B VITAMINA I RIBAVIRINA NA ODGOVOR GLIJSKIH ĆELIJA NAKON POVREDE MOZGA

U drugom delu rada ispitivan je odgovor astrocita na eksperimentalno izvedenu povredu mozga, kao i kako tretman različitim kombinacijama B vitamina i ribavirinom utiče na njihov odgovor. Takođe je praćen i uticaj kompleksa B vitamina i ribavirina na proces reaktivne glioze i formiranje glijskog ožiljka u regionu oko mesta povrede. Kao specifični markeri reaktivnih astrocita korišćeni su GFAP, vimentin i S100 β . Promene u ekspresiji ovih proteina praćene su na genskom i proteinskom nivou primenom RT-PCR i Western blot analize. Morfološke promene astrocita nakon lezije, kao i nakon tretmana detektovane su imunohistohemijskim obeležavanjem i imunofluorescentnom metodom. Stvaranju glijskog ožiljka na mestu povrede doprinose i NG2⁺ ćelije. Morfološke promene na ovim ćelijama detektovane su imunofluorescentnim bojenjem proteoglikana NG2.

4.3.1. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju GFAP nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

4.3.1.1. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju iRNK za GFAP nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga

Nivo ekspresije iRNK za GFAP u kori prednjeg mozga kontrolnih i operisanih pacova je praćen metodom RT-PCR analize u realnom vremenu.

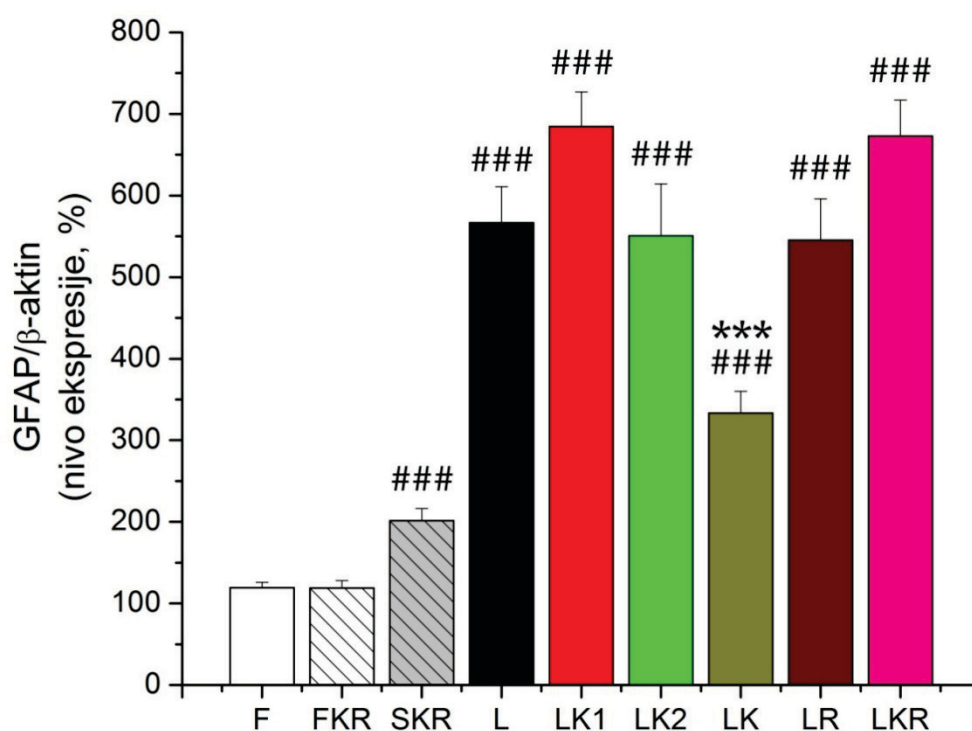
Ekspresija iRNK za GFAP u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

Primena kombinacije ribavirina i vitamina kod kontrolnih neoperisanih životinja (FKR) nije dovela do promene na nivou iRNK u odnosu na intaktnu fiziološku kontrolu (F) (Slika 32.). Kod lažno operisanih životinja (SKR) nivo ekspresije iRNK povećan je za 69% (###p<0,005) u odnosu na fiziološku grupu (Slika 32.).

Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju iRNK za GFAP nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Ekspresija ispitivanog transkripta nakon ASK povećana je za: 375% u L, 474% u LK1, 361% u LK2, 179% u LK, 357% u LR i 464% u LKR (sve grupe $###p<0,005$) u odnosu na fiziološki nivo.

Kombinacija svih pet B vitamina (LK) smanjuje za 52% ($***p<0,005$) nivo iRNK u odnosu na L grupu, dok ostali tretmani nemaju statistički značajan uticaj (Slika 32.).



*Slika 32. Promene u ekspresiji iRNK za GFAP u desnoj kori kontrolnih i operisanih životinja. Korišćena je metoda RT-PCR analize u realnom vremenu. Vrednosti su korigovane u odnosu na odgovarajuće vrednosti za β -aktin, a potom iskazane kao procenat promene u odnosu na fiziološku kontrolu. Rezultati u stubićima su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM; $###p<0,005$ vs F; $***p<0,005$ vs L za dati dan testiranja.*

4.3.1.2. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju GFAP proteina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga

Western blot (WB) metoda korišćena je za praćenje promene nivoa GFAP nakon ASK. Ekspresija ovog proteina izražena je u odnosu na fiziološku kontrolu kojoj je pripisana vrednost 100%.

Uticaj B vitamina i ribavirina na ekspresiju GFAP proteina u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

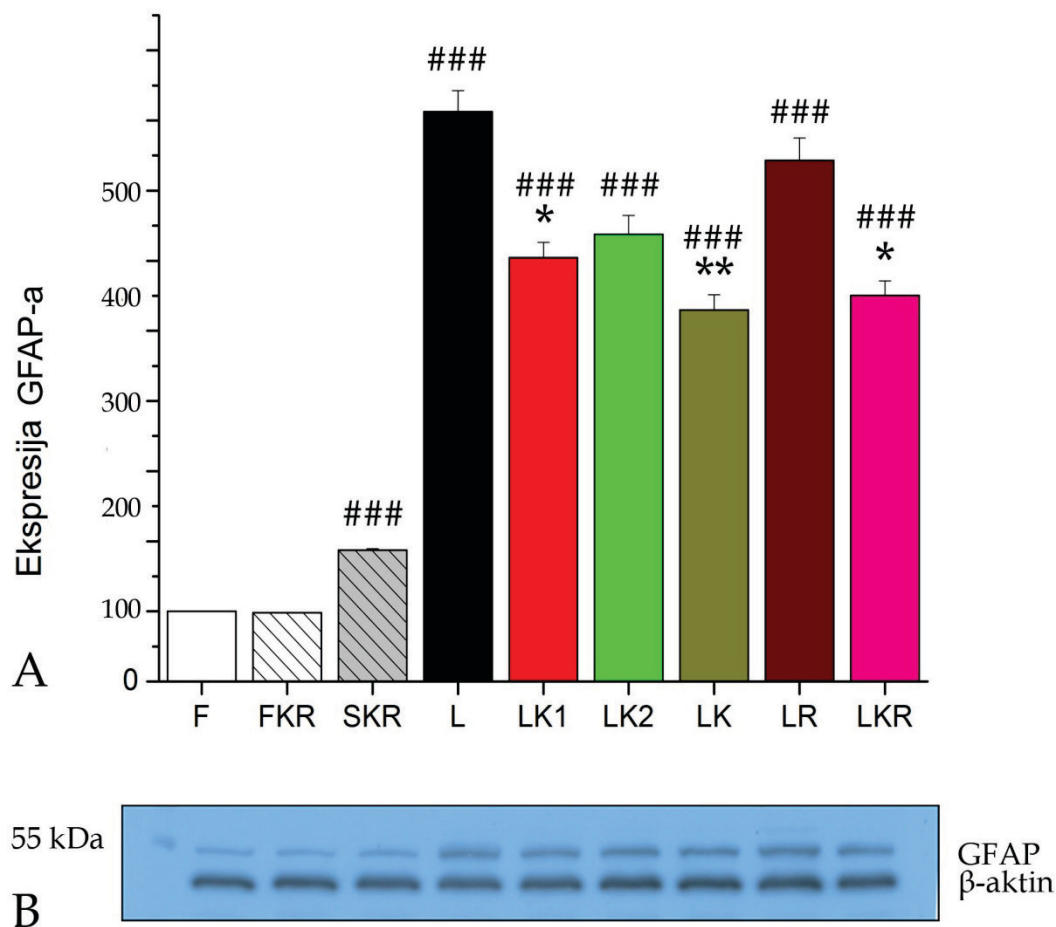
Primena kombinacije ribavirina i vitamina kod kontrolnih neoperisanih životinja (FKR) nije dovela do promene na nivou količine proteina u odnosu na intaktnu fiziološku kontrolu (F) (Slika 33.). Kod lažno operisanih životinja (SKR) za 87% je povećana (### $p < 0,005$) ekspresija GFAP u odnosu na F kontrolnu grupu (Slika 33.).

Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju GFAP proteina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Imunoblot analiza na uzorcima proteina izolovanih iz desne (operisane) kore prednjeg mozga 14. dana nakon ASK pokazala je statistički značajno povećanje u ekspresiji GFAP u svim operisanim grupama u odnosu na fiziološku kontrolu (### $p < 0,005$) i to: za 712% L, 504% LK1, 537% LK2, 429% LK, 642% LR i 450% LKR grupa.

Tretmani različitim kombinacijama B vitamina smanjuju ekspresiju GFAP u odnosu na L grupu i to: za 29% kod LK1 životinja ($*p < 0,05$), za 25% u LK2 i 40% u LK grupi ($**p < 0,01$) (Slika 33.).

Kod životinja koje su primale samo ribavirin nije bilo statistički značajnih promena, dok je kombinacija ribavirina i B vitamina za 37% smanjila nivo ekspresije ovog proteina u odnosu na L grupu ($*p < 0,05$) (Slika 33.).



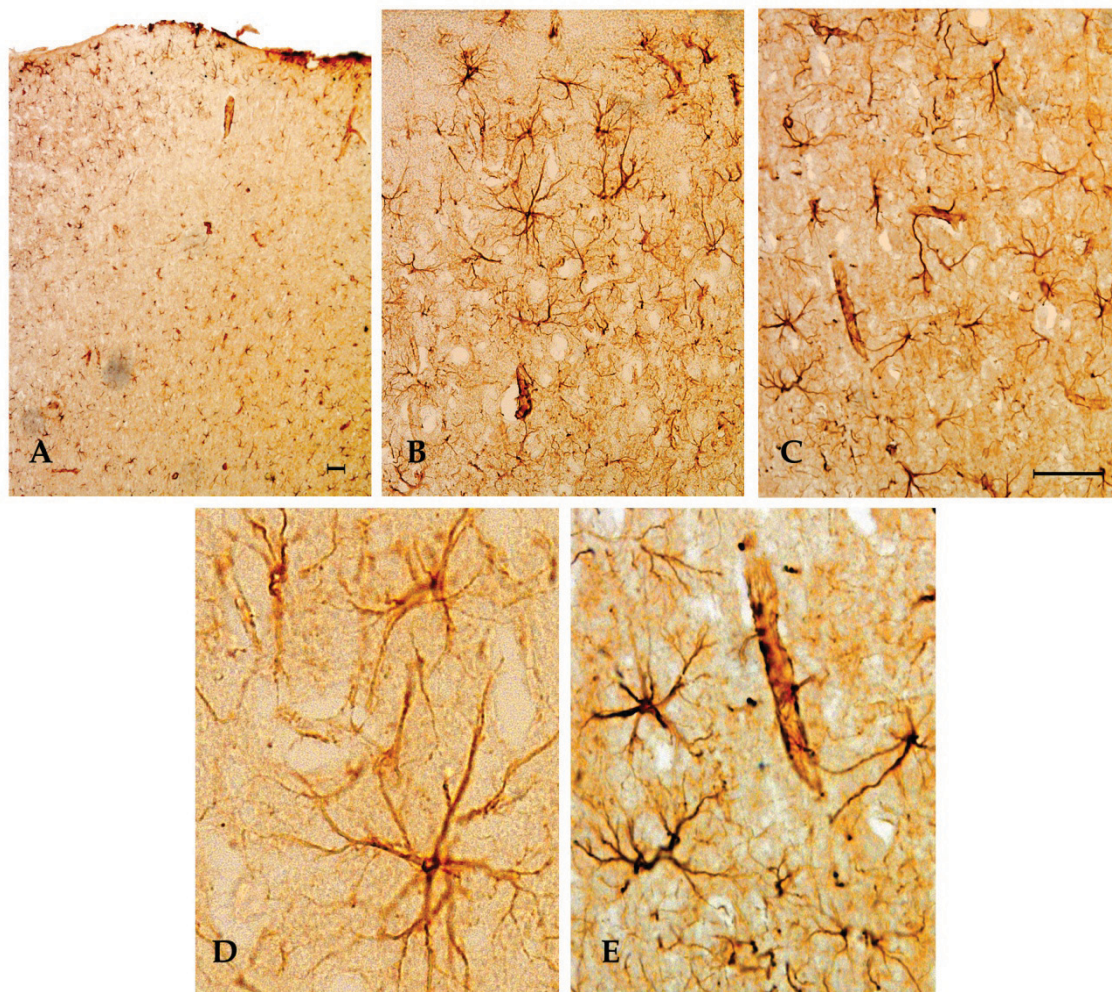
Slika 33. Imunoblot analiza ekspresije GFAP proteina. A: Imunoblot analiza ekspresije GFAP proteina u desnoj kori kontrolnih i operisanih životinja. Vrednosti optičkih gustina traka na imunoblotu korigovane su u odnosu na odgovarajuće optičke gustine za aktin, a potom normalizovane u odnosu na fiziološku kontrolu (100%). Rezultati u stubićima su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM. ### $p < 0,005$ vs F; * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ vs L za dati dan testiranja. B: Prikazan je reprezentativni snimak imunoblota. U bunariće je naliveno 10 μ g proteina. Antitelo na GFAP na imunoblotu daje specifičnu traku na oko 50 kDa.

4.3.1.3. Imunohistohemijska detekcija GFAP proteina u kori prednjeg mozga pacova nakon tretmana različitim kombinacijama B vitamina i ribavirina

Ekspresija ovog proteina, specifičnog markera zrelih astrocita, praćena je i imunohistohemijskim obeležavanjem koronalnih preseka kontrolnih i operisanih životinja.

Imunohistohemijsko obeležavanje GFAP proteina u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

Imunohistohemijskim obeležavanjem GFAP proteina, intermedijarnog filameta zrelih astrocita, uočili smo intenzivno obojene astrocitne ćelije u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova (Slika 34. A-C). U sivoj masi kore astrociti su malog tela i dugačkih, tankih i razgranatih nastavaka (Slika 34. D, E).



Slika 34. Imunohistohemijsko obeležavanje GFAP proteina u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova. Reprezentativni koronalni preseki mozga F životinja(A-E). Slike D i E su uveličani detalji sa B i C. Skala 50 μ m.

Kao što se vidi na slikama 34. B-E, razgranati nastavci jednog astrocita se ne preklapaju sa nastavcima drugih astrocita. Na taj način se formira mikrosredina svakog astrocita koji samo krajnjim distalnim delovima nastavaka uspostavljaju veze sa drugim ćelijama. Na slici 34. C i na većem uveličanju

(Slika 34. E) primećuju se astrociti koji svojim završnim stopalima uspostavljaju kontakt sa krvnim sudovima (strelica).

Tretman B vitaminima i ribavirinom ne menja morfologiju astrocita kod FK R i SK R grupa (rezultati nisu prikazani).

Imunohistohemijsko obeležavanje GFAP proteina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Četrnaestog dana nakon ASK kod životinja iz L grupe (Slika 35. A-C), primećeno je povećanje broja GFAP⁺ astrocita u odnosu na kontrolne gupe (Slika 34.). Najveći broj astrocita se nalazi u širokom obodu oko mesta lezije i potpuno je ograničava učestvujući u formiranju glijskog ožiljka (Slika 35. A, B), dok se u ostalim oblastima ipsilateralne kore ne opaža pojačano bojenje na GFAP. U odnosu na astrocite kontrolnih životinja (Slika 34. D, E), astrociti oko lezije imaju karakterističnu morfologiju: kraće i deblje nastavke i hipertrofirano telo i označeni su kao reaktivni astrociti (Slika 34. C, insert). Promene koje se dešavaju na ovim ćelijama nakon ASK dovele su do preklapanja i preplitanja citoplazmatičnih nastavaka susednih astrocitnih ćelija (Slika 35. C) i narušavanja mikrosredina pojedinačnih ćelija.

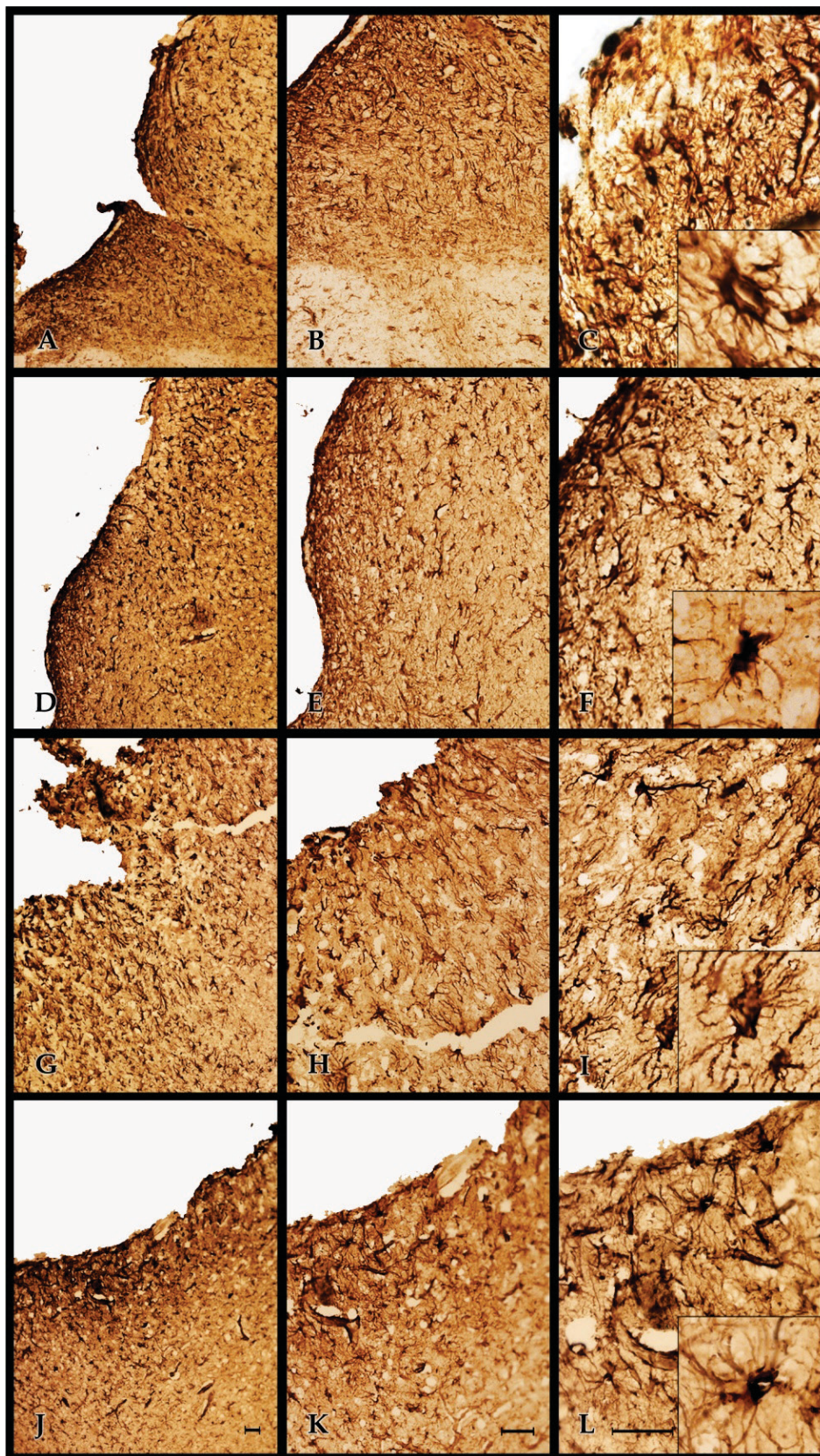
Uticao različiti kombinacija B vitamina na imunohistohemijsko obeležavanje GFAP proteina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Na presecima mozgovia izolovanih iz životinja koje su nakon ablacije prošle tretman B vitaminima (LK1, LK2, LK) značajno je slabija GFAP imunoreaktivnost (Slika. 35. D-L). Reaktivni astrociti su zapažaju samo u delu kore neposredno uz leziju (Slika 35. D, G, J), ali u mnogo manjem broju u odnosu na L grupu (Slika 35. A-C). Pored toga ovi astrociti imaju izmenjenu morfologiju, najzastupljeniji su astrociti sa tankim i dugim nastavcima i bez odlika hipertrofije tela (Slika 35. F, I, L) slično astrocitima koji se vide u kontrolnim presecima. Na većem uvećanju se vidi da se morfologija astrocita menja u zavisnosti od toga kojim koktelom B vitamina su tretirane životinje.

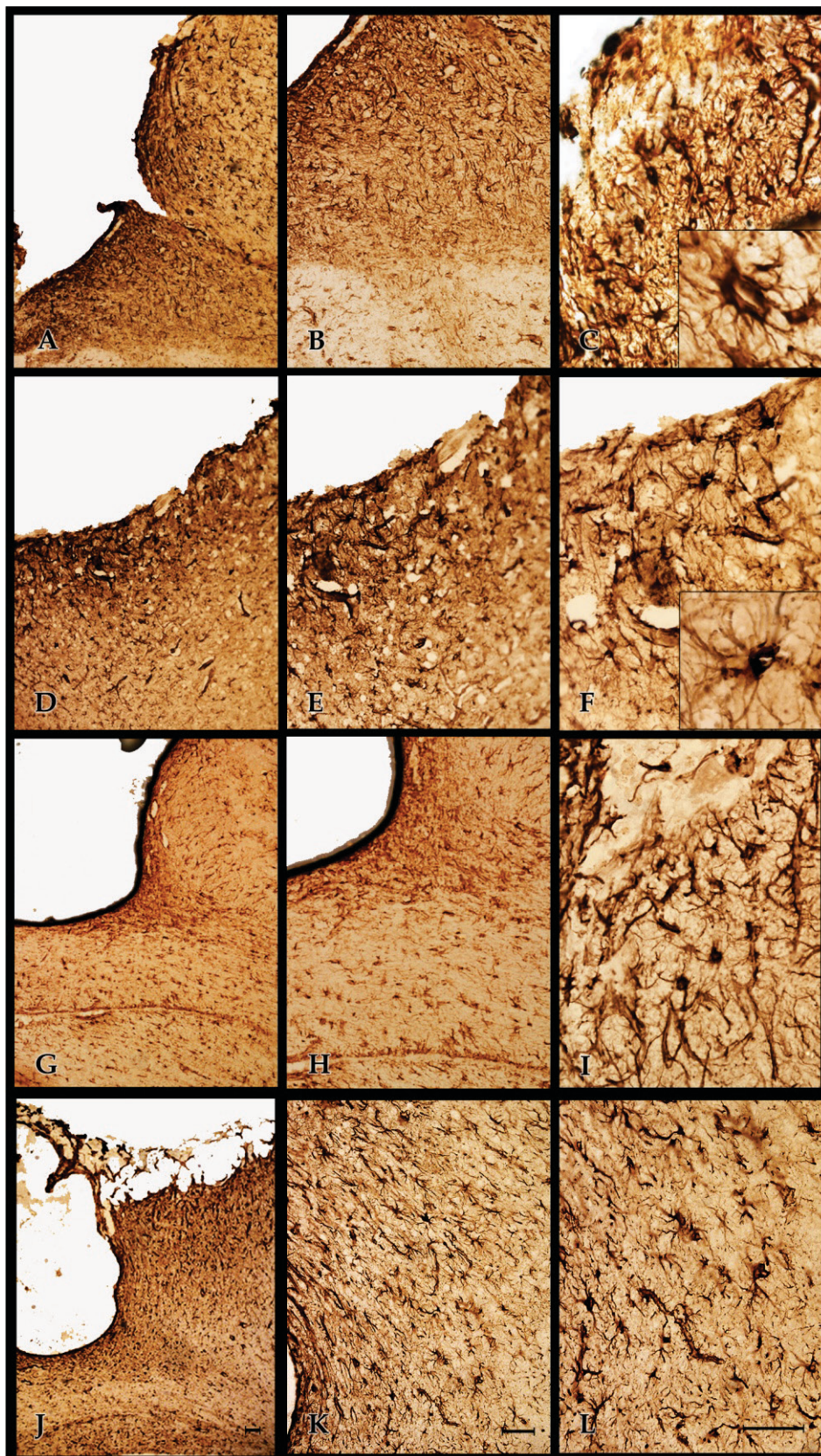
Tako, nakon tretmana LK1 koktelom astrociti gotovo da nemaju nastavke, toliko su oni tanki (Slika 35. F insert), dok je nakon LK2 tretmana njihovo telo nesto manje, ali je broj kraćih, razgranatih nastavaka veći (Slika 35. I insert). Nakon tretmana LK koktelom astrociti imaju malo, okruglo telo sa velikim brojem dugih, razgranatih i tankih nastavaka (Slika 35. L insert).

Uticaj kombinacija B vitamina i ribavirina na imunohistohemijsko obeležavanje GFAP proteina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Tretman ribavirinom (Slika 36. G-I), takođe, drastično smanjuje broj astrocita aktiviranih povredom senzomotorne kore. U poređenju sa LK grupom imunoreakcija je slabija i prisutna je samo uz ivicu lezije (slika 36. G, H), gde ima izvestan broj reaktivnih astrocita. Njihova morfologija je takođe promenjena (Slika 36. I) i oni ne formiraju gustu mrežu isprepletenih nastavaka kao što je to slučaj kod L grupe (Slika 36. C). Rezultati GFAP imunobojenja kod LKR grupe (Slika 36. J-L) slični su onima viđenim kod LK životinja (Slika 36. D-F). Smanjen je intenzitet imunoreakcije i broj obojenih astrocita. Većina astrocita, čak i u blizini lezije ima formu sa manjim telom i tankim, dugim nastavcima (Slika 36. K,L) po čemu su sličniji astrocitima viđenim u kontrolnim presecima.



Slika 35. Imunohistohemijsko obeležavanje GFAP proteina nakon ASK i tretmana različitim kombinacijama B vitamina. Reprezentativni koronalni preseki mozgova L (A-C), LK1 (D-F), LK2 (G-I) i LK (J-L) životinja. Skala 50 μ m.



Slika 36. Imunohistohemijsko obeležavanje GFAP proteina nakon ASK i tretmana različitim kombinacijama B vitamina i ribavirina. Reprerzentativni koronalni preseki mozgova L (A-C), LK (D-F), LR (G-I) i LKR (J-L) životinja. Skala 50 μ m.

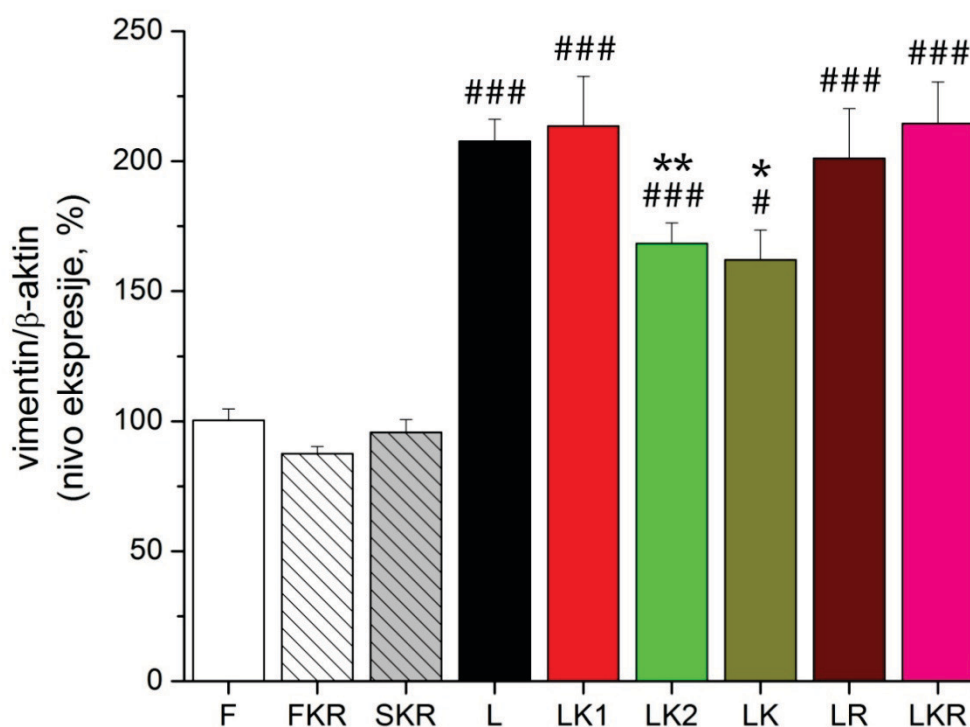
4.3.2. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju vimentina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

4.3.2.1. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju iRNK za vimentin nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga

Nakon ASK prednjeg mozga pacova ispitana je promena ekspresije vimentina na nivou iRNK, metodom RT-PCR analize u realnom vremenu. Dobijeni rezultati su izraženi kao procenat (%) promene u odnosu na fiziološku kontrolu (F).

Ekspresija iRNK za vimentin u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

Primena kombinacije ribavirina i vitamina B kod kontrolnih neoperisanih (FKR), kao i lažno operisanih životinja (SKR) nije dovela do značajne promene na nivou iRNK u odnosu na intaktnu fiziološku kontrolu (F) (Slika 37.).



Slika 37. Ekspresija iRNK za vimentin u desnom korteksu kontrolnih i operisanih životinja. Korišćena je metoda RT-PCR analize u realnom vremenu. Vrednosti su korigovane u odnosu na odgovarajuće vrednosti za β -aktin, a potom normalizovane u odnosu na fiziološku kontrolu. Rezultati u stubićima su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM. # $p < 0,05$; ### $p < 0,005$ vs F; * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ vs L za dati dan testiranja.

Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju iRNK za vimentin nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

U odnosu na fiziološku kontrolu nivo ekspresije iRNK za vimentin 14. dana nakon ASK (Slika 37.) statistički značajno je povećan u svim operisanim grupama i to za: 208% u L (### $p < 0,005$), 214% u LK1 (### $p < 0,005$), 168% u LK2 (### $p < 0,005$), 162% u LK (# $p < 0,05$), 201% u LR (### $p < 0,005$) i 214% u LKR (### $p < 0,005$).

Tretmani različitim kombinacijama B vitamina smanjuju nivo iRNK za vimentin u odnosu na L grupu i to za: 20% u LK2 (* $p < 0,05$) i 22% u LK grupi (* $p < 0,05$). Rezultati dobijeni za LK1 grupu nisu značajno različiti u odnosu na L grupu.

Ekspresija iRNK za vimentin nakon tretmana ribavirinom ili njegovom kombinacijom sa B vitaminima nije značajno promenjena u odnosu na rezultate L grupe (Slika 37.).

4.3.2.2. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju vimentina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga

Uticaj B vitamina i ribavirina na ekspresiju vimentina u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

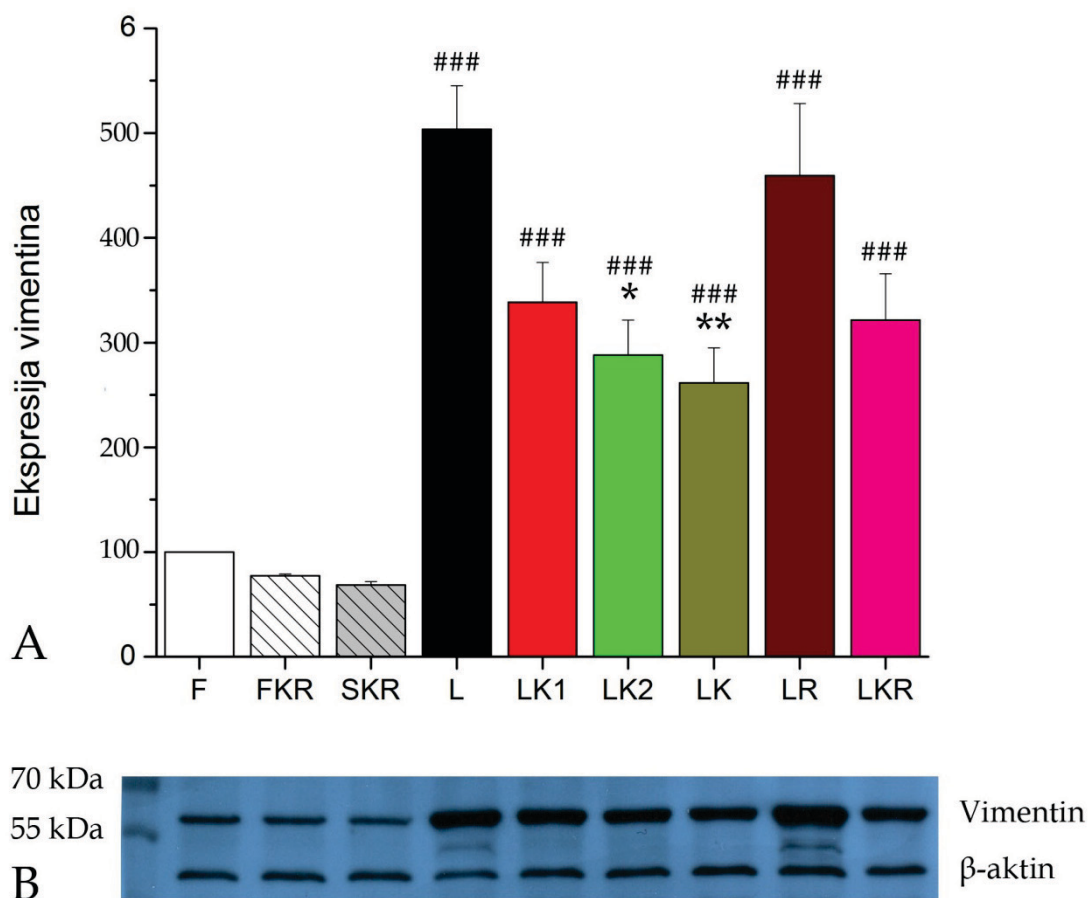
Ekspresija vimentina praćena je Western blot metodom i izražena je u procentima (%) promene u odnosu na fiziološku kontrolu (Slika 38.).

Primena kombinacije ribavirina i vitamina kod kontrolnih neoperisanih (FKR), kao i lažno operisanih životinja (SKR) nije dovela do statistički značajne promene ekspresije vimentina u odnosu na fiziološku kontrolu.

Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju vimentina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Imunoblot analiza na uzorcima proteina izolovanih iz DK prednjeg mozga pacova 14. dana nakon ablacije pokazala je statistički značajno povećanje u ekspresiji vimentina u svim operisanim grupama u odnosu na fiziološku

kontrolu (Slika 38.) i to za: 503% L, 327% LK1, 285% LK2, 252% LK, 456% LR i 320% LKR grupa.



Slika 38. Imunoblot analiza ekspresije vimentina. A: Imunoblot analiza ekspresije vimentina u DK kod kontrolnih životinja i 14. dana nakon povrede. Vrednosti optičkih gustina traka na imunoblotu korigovane su u odnosu na odgovarajuće optičke gustine za aktin, a potom iskazane kao procenat (%) promene u odnosu na fiziološku kontrolu (vrednost 100%). Rezultati u stubićima su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM. ### $p < 0,005$ vs F; * $p < 0,05$ i *** $p < 0,005$ vs L za dati dan testiranja. B: Prikazan je reprezentativni snimak imunoblota. U bunariće je naliveno 10 μ g proteina. Antitelo na vimentin na imunoblotu daje jednu specifičnu traku na oko 58 kDa.

Tretmani različitim kombinacijama B vitamina smanjuju ekspresiju vimentina u odnosu na L grupu i to: za 33% kod LK1 životinja, za 43% u LK2 (* $p < 0,05$) i 48% u LK grupi (** $p < 0,01$).

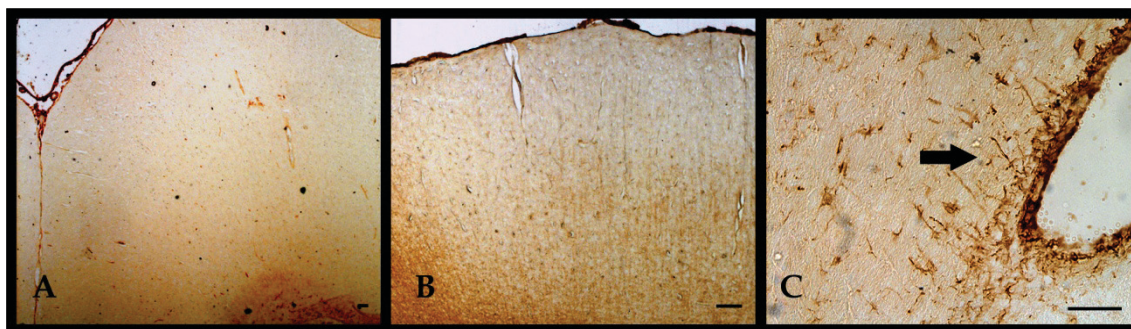
Ekspresija ovog proteina nakon povrede nije promenjena kod grupe tretirane ribavirinom, dok je kombinacija B vitamina i ribavirina za 36% smanjila nivo ekspresije u odnosu na L grupu.

4.3.2.3. Imunohistohemijaska detekcija vimentina u kori prednjeg mozga pacova nakon tretmana različitim kombinacijama B vitamina i ribavirina

Ekspresija vimentina ispitivana je i imunohistohemijaskom metodom.

Imunohistohemijasko obeležavanje vimentina u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

Fiziološki nivo ekspresije vimentina praćen je na presecima prednjeg mozga pacova koji nisu prošli nikakvu operacionu proceduru (F). Pokazana je slaba imunoreaktivnost moždanog tkiva (Slika 39. A, B) izuzev u zonama uz ventrikulu gde se intenzivno boje ćelije radijalne glije (Slika 39. C, strelica). Ovi rezultati pokazuju da je u adultnom mozgu u fiziološkim uslovima prisutan mali broj nezrelih astrocita. Ista slika je dobijena i kod lažno operisanih i kontrolnih grupa koje su primale kombinaciju ribavirina i B vitamina (SKR i FKR) (rezultati nisu prikazani).



Slika 39. Imunohistohemijasko obeležavanje vimentina u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova. Reprezentativni koronalni preseki mozga F (A-C) životinja. Skala 50 μ m.

Imunohistohemijasko obeležavanje vimentina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

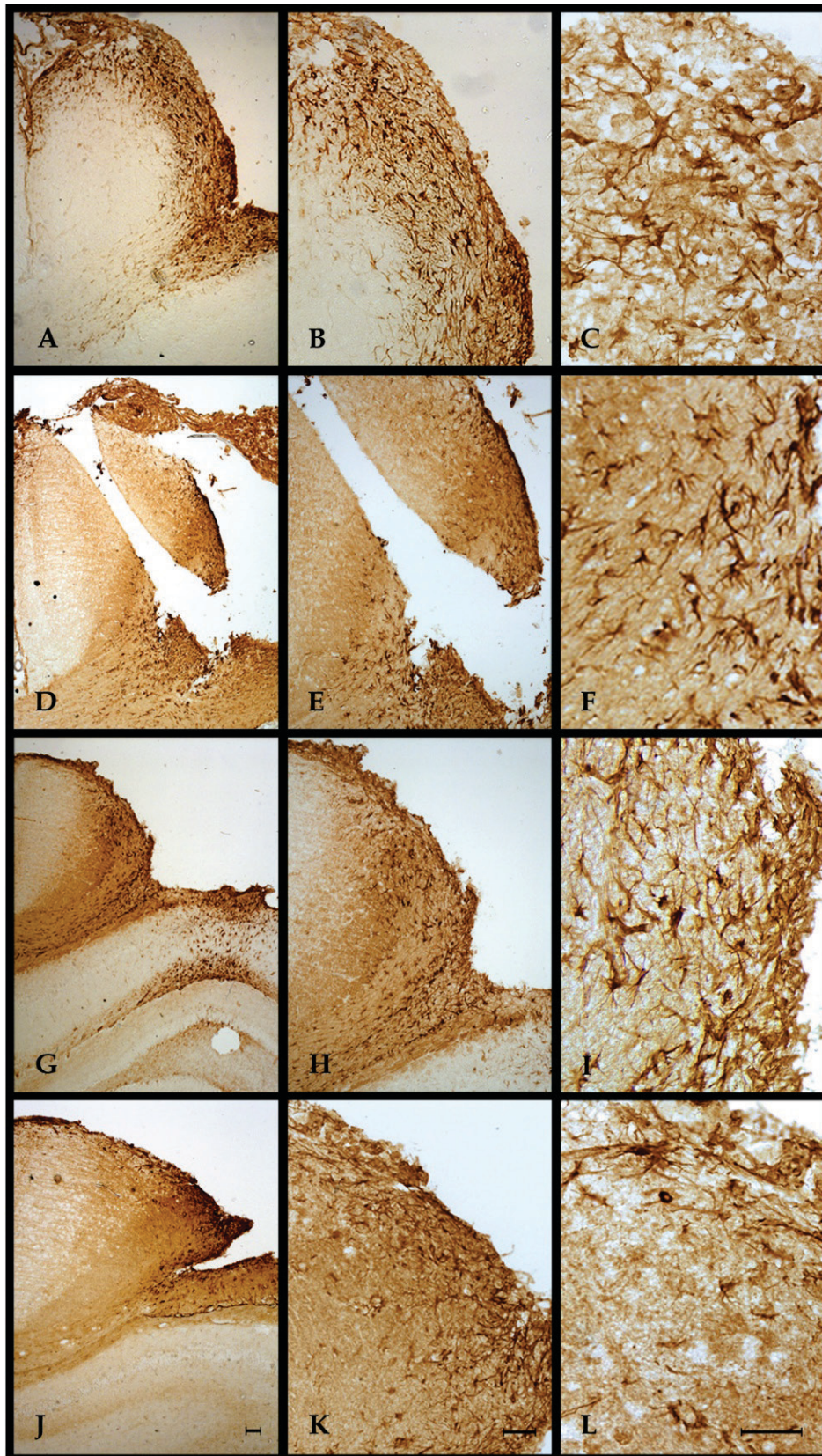
Na presecima mozgova 14. dana nakon lezije uočava se snažna imunoreakcija na vimentin u širokom delu kore oko mesta povrede (Slika 40. A-C). Jaka obojenost astrocita ukazuje na visok sadržaj vimentina u njima i potvrđuje da pripadaju reaktivnim astrocitima. Ove ćelije formiraju gustu mrežu uz ivice lezije, karakterišu se krupnim telom i većim brojem zadebljelih nastavaka (Slika 40. C).

Uticaj različitih kombinacija B vitamina na imunohistohemijsko obeležavanje vimentina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

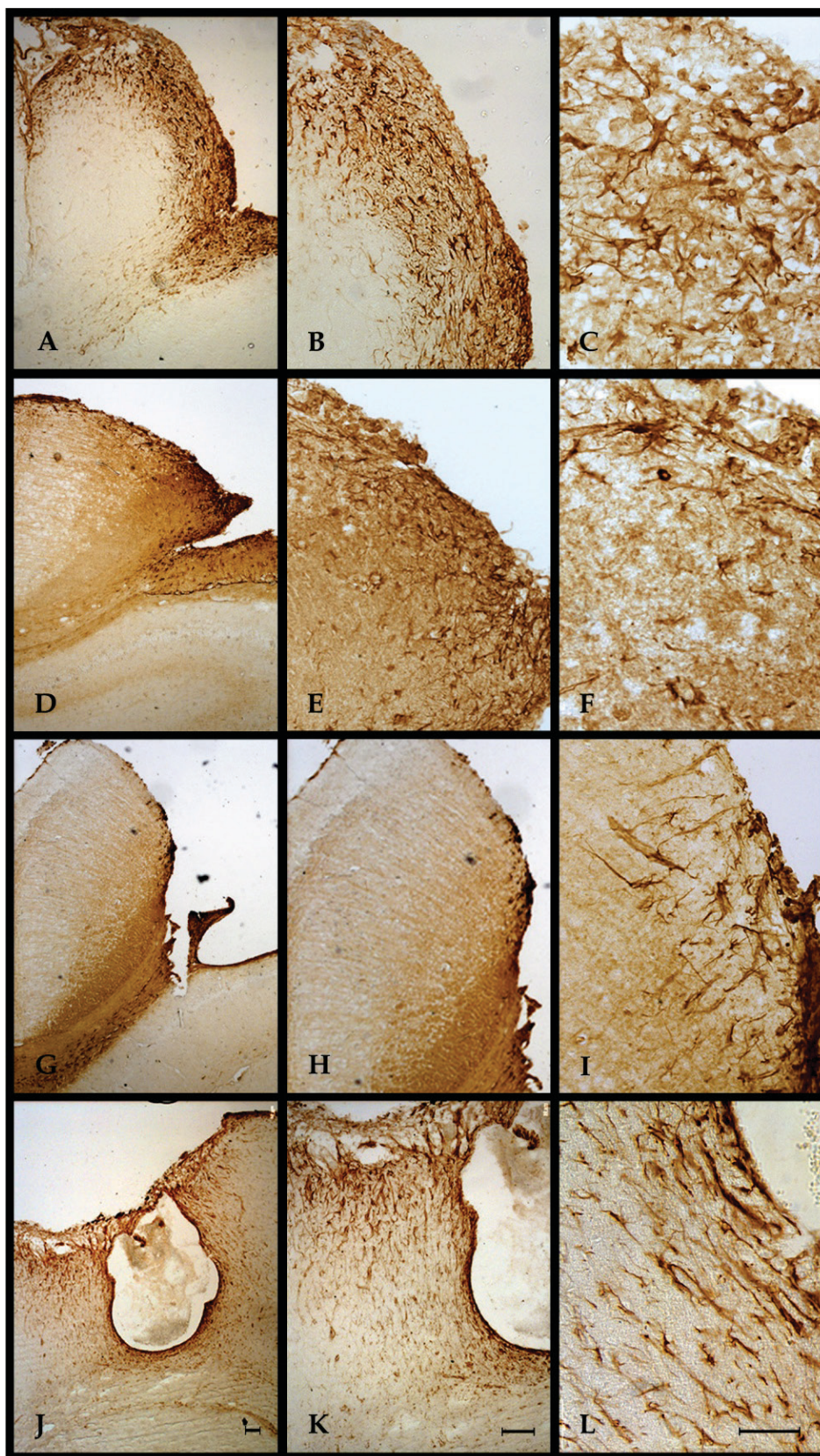
Kod LK1 životinja smanjen je intenzitet imunobojenja i manji je sloj kore uz leziju u kom se javlja imunoreakcija (Slika 40. D, E) u odnosu na L grupu (Slika 40. A-C). Takođe, nakon tretmana B vitaminima, vimentin⁺ reaktivni astrociti manje su brojni i ne formiraju gustu mrežu (Slika 40. F). Slični rezultati dobijeni su i u druge dve grupe nakon postoperativnog tretmana kombinacijom B vitamina (LK2 i LK). Značajno je smanjen broj vimentin⁺ astrocita (Slika 40. I, L). U poređenju sa L grupom imunoreakcija je slabija i prisutna samo u uskom regionu oko mesta lezije (Slika 40. G, H, J, K).

Uticaj kombinacija B vitamina i ribavirina na imunohistohemijsko obeležavanje GFAP proteina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Nakon tretmana ribavirinom (Slika 41. G-I) značajno se smanjuje broj vimentin⁺ astrocita aktiviranih povredom senzomotorne kore (Slika 41. A-C). U poređenju sa L grupom imunoreakcija je slabija i prisutna samo uz ivicu lezije (Slika 41. G). Većina astrocita, čak i u blizini lezije ima mirujuću formu sa malim telom i tankim, dugim nastavcima (Slika 41. H, I). Rezultati imunobojenja vimentina kod LKR grupe (Slika 41. J-L) slični su onima viđenim kod LK životinja (Slika 41. D-F). Smanjen je intenzitet imunoreakcije i broj obojenih astrocita, ali ne u istoj meri kao nakon tretmana samo ribavirinom.



Slika 40. Imunohistohemijsko obeležavanje vimentina nakon ASK i tretmana različitim kombinacijama B vitamina. Reprerzentativni koronalni preseki mozgova L (A-C), LK1 (D-F), LK2 (G-I) i LK (J-L) životinja. Skala 50 μ m.



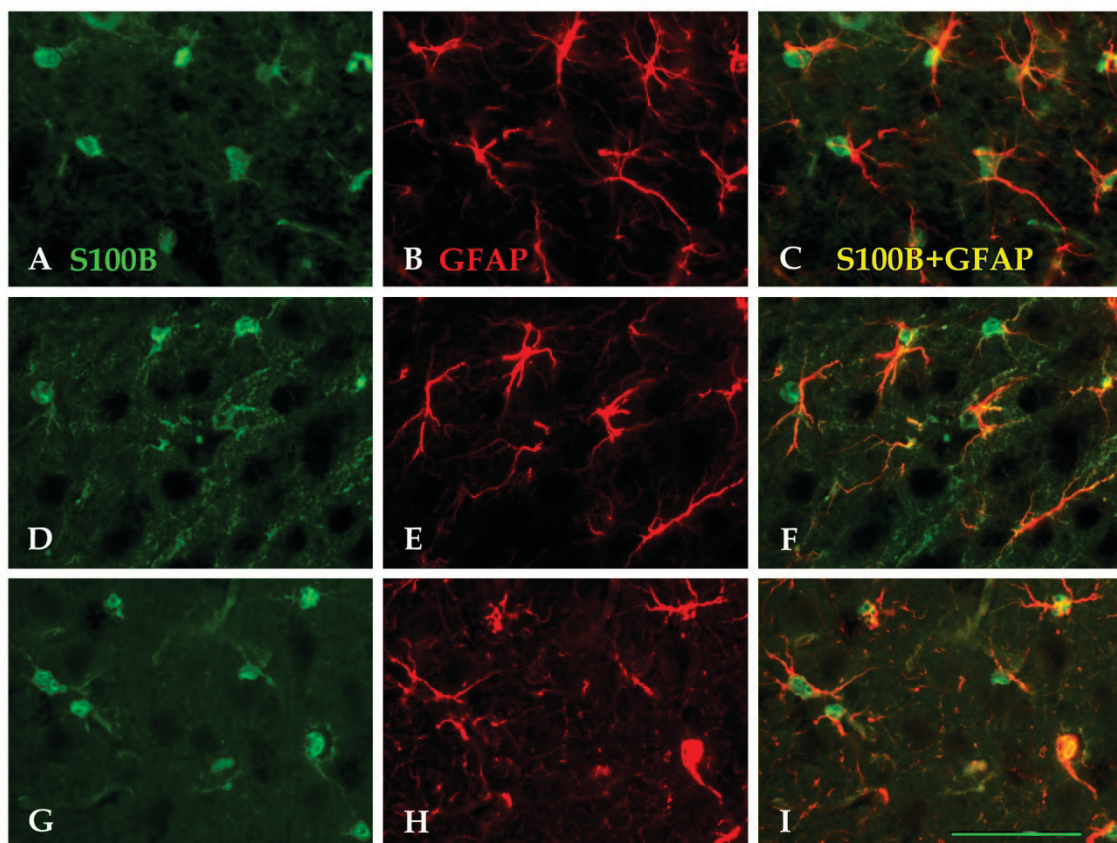
Slika 41. Imunohistohemijsko obeležavanje vimentina nakon ASK i tretmana različitim kombinacijama B vitamina i ribavirina. Reprezentativni koronalni preseki mozga L (A-C), LK (D-F), LR (G-I) i LKR (J-L) životinja. Skala 50 μ m.

4.3.3. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju S100B nakon nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

S100B je protein koji vezuje kalcijum i proizvode ga većinom astrociti. Pokazano je da se njegova koncentracija značajno povećava nakon traumatske povrede moždanog tkiva. Takođe, poznato je da pored ostalog on ima ulogu i u modifikaciji citoskeleta, proliferaciji, diferencijaciji i migraciji astrocita, kao i u regulaciji njihove morfologije (Rothermundt i sar., 2003, Brozzi et al., 2009). Stoga je bilo interesantno da se ustanovi šta se dešava sa ekspresijom S100B proteina u astrocitima kod životinja tretiranih B vitaminima i ribavirinom.

Ekspresija S100B i GFAP u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

U fiziološkim uslovima na kontrolnim presecima S100B pozitivna imunoreakcija uočava se na ćelijskom telu, a u manjoj meri je prisutna i na citoplazmatičnim nastavcima astrocita (Slika 42. A, C). Za razliku od S100B, intenzivna GFAP imunoreakcija se uočava kako u telu, tako i u nastavcima astrocita (Slika 42. B, C). Tretman kombinacijom svih pet B vitamina i ribavirina kod intaktne grupe (FKR), kao i kod sham životinja (SKR) ne menja obrazac ekspresije posmatrana dva markera astrocita (Slika 42. D-I).



Slika 42. Dvojno imunofluorescentno obeležavanje S100B (zeleno) i GFAP (crveno) proteina u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova. Reprerzentativni koronalni presecci F (A-C), FKR (D-F) i SKR (G-I) životinja. Skala 50 μ m.

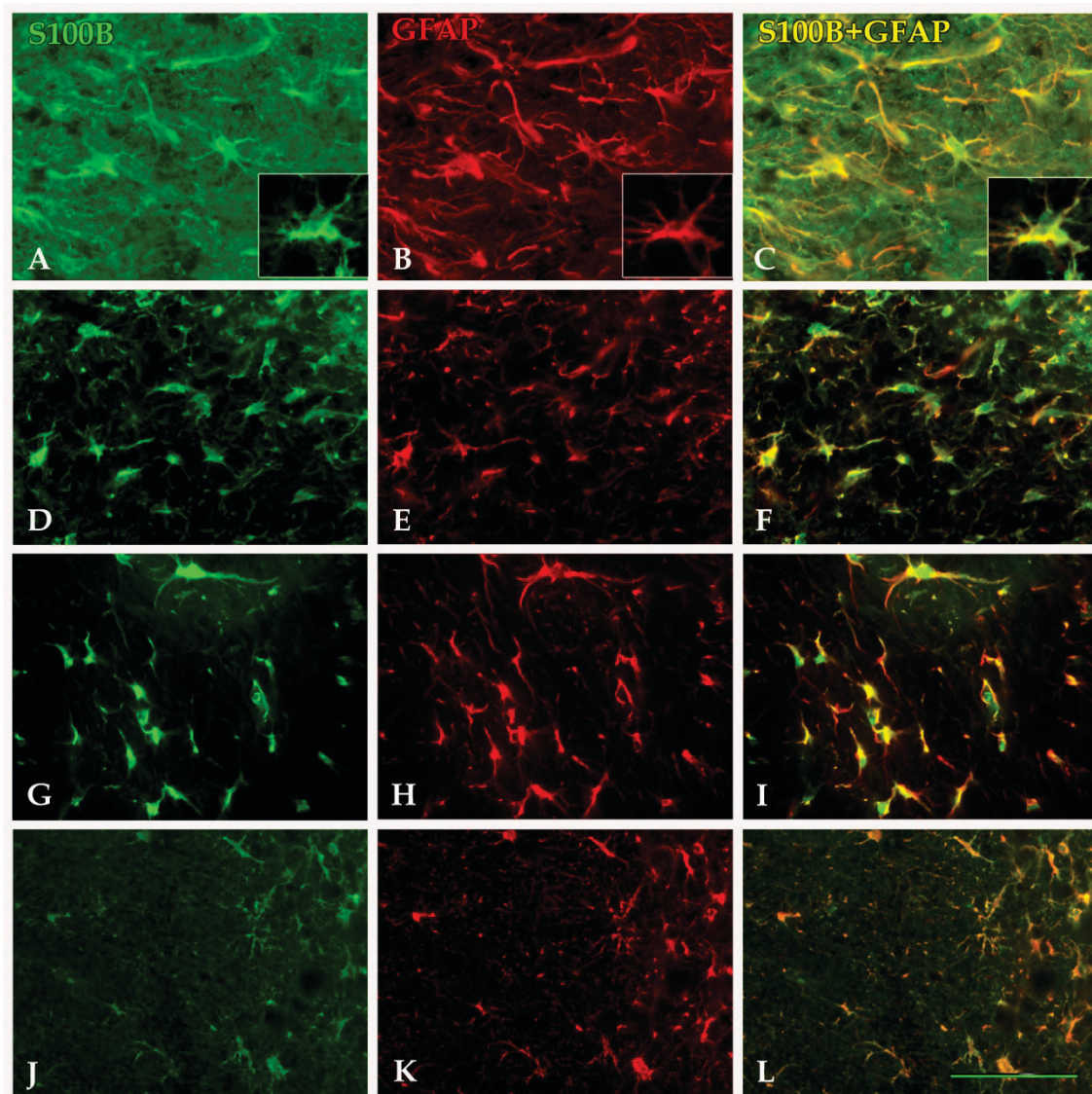
Imunofluorescentno obeležavanje S100B i GFAP nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Nakon ablacije moždanog tkiva, kod L grupe zapaža se pojačana ekspresija i GFAP i S100B proteina (Slika 43. A-C), i njihova kolokalizacija u hipertrofiranom telu i u zadebljalim kraćim nastavcima reaktivnih astrocita (Slika 43. A-C, insert).

Uticaj kombinacija B vitamina i ribavirina na imunofluorescentno obeležavanje S100B i GFAP nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Kod životinja koje su tretirane koktelom svih pet B vitaminima - LK (Slika 43. D-F), ribavirinom -LR (Slika 43. G-I) ili njihovom kombinacijom - LKR (Slika 43. J-L) kolokalizacija dva ispitivana proteina slična je slici viđenoj kod

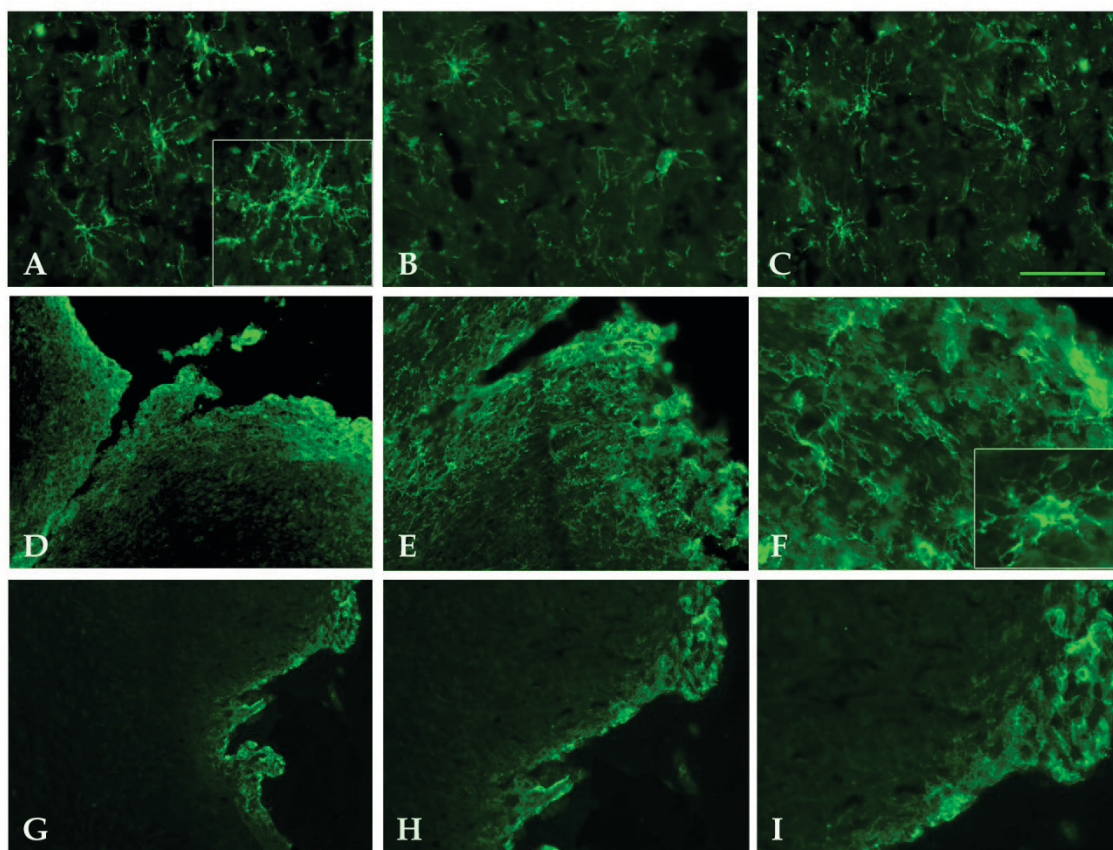
kontrolne grupe životinja (Slika 42.). Sva tri tretmana dovode do značajnog smanjenja broja reaktivnih astrocita i menjaju njihovu morfologiju ka mirujućoj formi astrocita i to sa sledećom efikasnošću LKR >> LR > LK.



Slika 43. Dvojno imunofluorescentno obeležavanje S100B (zeleno) i GFAP (crveno) proteina u kori prednjeg mozga pacova 14.dana nakon ASK. Reprezentativni koronalni preseki L (A-C), LK (D-F), LR (J-L) i LKR (G-I) životinja. Skala 50 μ m.

4.3.4. Uticaj kombinacije B vitamina na ekspresiju NG2 nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

NG2 glikoprotein pripada porodici hondroitin sulfatnih proteoglikana. U toku razvića mozga sintetišu ga i luče oligodendrocitne prekursorske ćelije (OPC). Nakon povrede mozga njegova ekspresija je povećana u glijskom ožiljku gde ga, pored OPC, oslobađaju i ćelije glije i makrofagi. U prethodnim istraživanjima pokazali smo da tretman kombinacijom svih pet B vitamina (LK) u većini slučajeva ima najjače dejstvo te ćemo u daljim eksperimentima pratiti efekat ovog koktela B vitamina na procese oporavka nakon ASK.



Slika 44. Imunofluorescentno obeležavanje NG2 u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova i 14. dana nakon ASK. Reprezentativni koronalni preseki F (A), FKR (B), SKR (C), L (D-F) i LK (G-I) životinja. Skala 50 μ m.

Ekspresija NG2 u kori prednjeg mozga kontrolnih i operisanih pacova

Kod svih kontrolnih životinja u kori prednjeg mozga uočavaju se NG2 pozitivne ćelije karakteristične multipolarne morfologije (Slika 44. A-C), sa brojnim veoma razgranatim nastavcima koji su sferično orjentisani (Slika 44. A,

insert). Četrnaestog dana nakon povrede intenzivna NG2 imunoreaktivnost uočava se u širokoj zoni oko mesta povrede (Slika 44. D, E). Na većem uveličanju (Slika 44. F) primetno je povećanje broja ovih ćelija kao i promena morfologije u odnosu na kontrolne grupe. Dolazi do hipertrofije tela i smanjuje se razgranatost nastavaka (Slika 44. F, insert). Kod životinja tretiranih kombinacijom svih 5 vitamina ne uočavaju se NG2 reaktivne ćelije, već se oko mesta lezije primećuje slabo povećanje ekspresije slobodnog hondroitin sulfatnog proteoglikana NG2 (Slika 44.G-I).

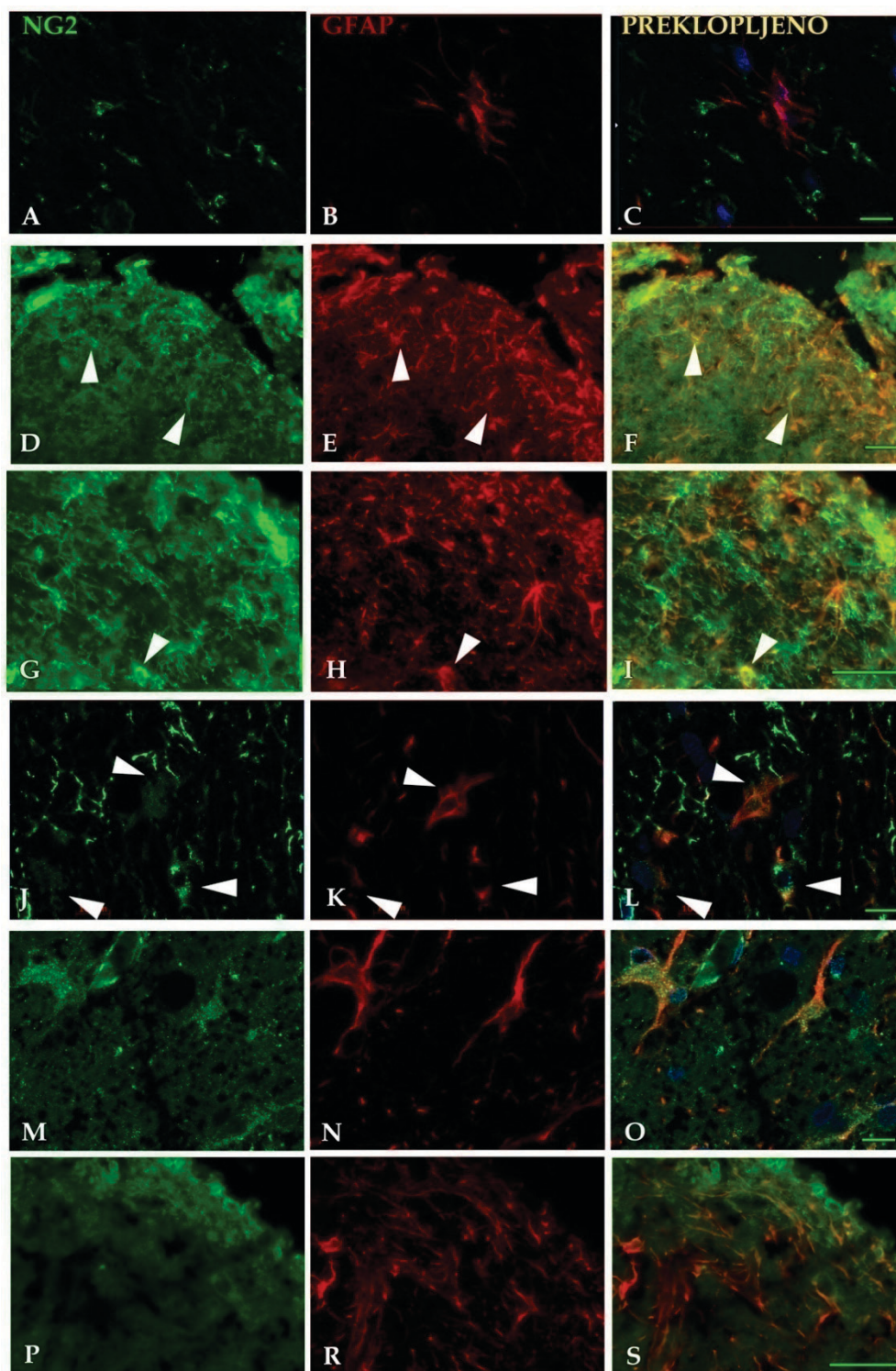
Ekspresija NG2 i GFAP u kori prednjeg mozga kontrolnih i operisanih pacova

Poznato je da reaktivni astrociti (jedan deo ovih ćelija na mestu povrede može nastati od NG2 ćelija) nakon povrede luče NG2 hondroitin sulfatni proteoglikan. Da bi smo to potvrdili dvojnim imunofluorescentnim bojenjem pratili smo kolokalizaciju antitela na NG2 i GFAP. Kod kontrolne intaktne grupe (Slika 44-1. A-C) i životinja koje su nakon ASK primale kombinaciju svih pet B vitamina (Slika 44-1. P-S) nismo uočili kolokalizaciju ispitivanih markera. Međutim, kod operisanih L životinja u delu kore oko mesta povrede mogu se uočiti sporadične ćelije (Slika 44-1. D-E, vrh strelice) kod kojih je utvrđena koekspresija NG2 i GFAP proteina (Slika 44-1. J-O, vrh strelice). Može se primetiti da se NG2 imunoreaktivnost u vidu "oblaka" uočava oko tela reaktivnih GFAP⁺ astrocita (Slika 44-1. M, O, vrh strelice).

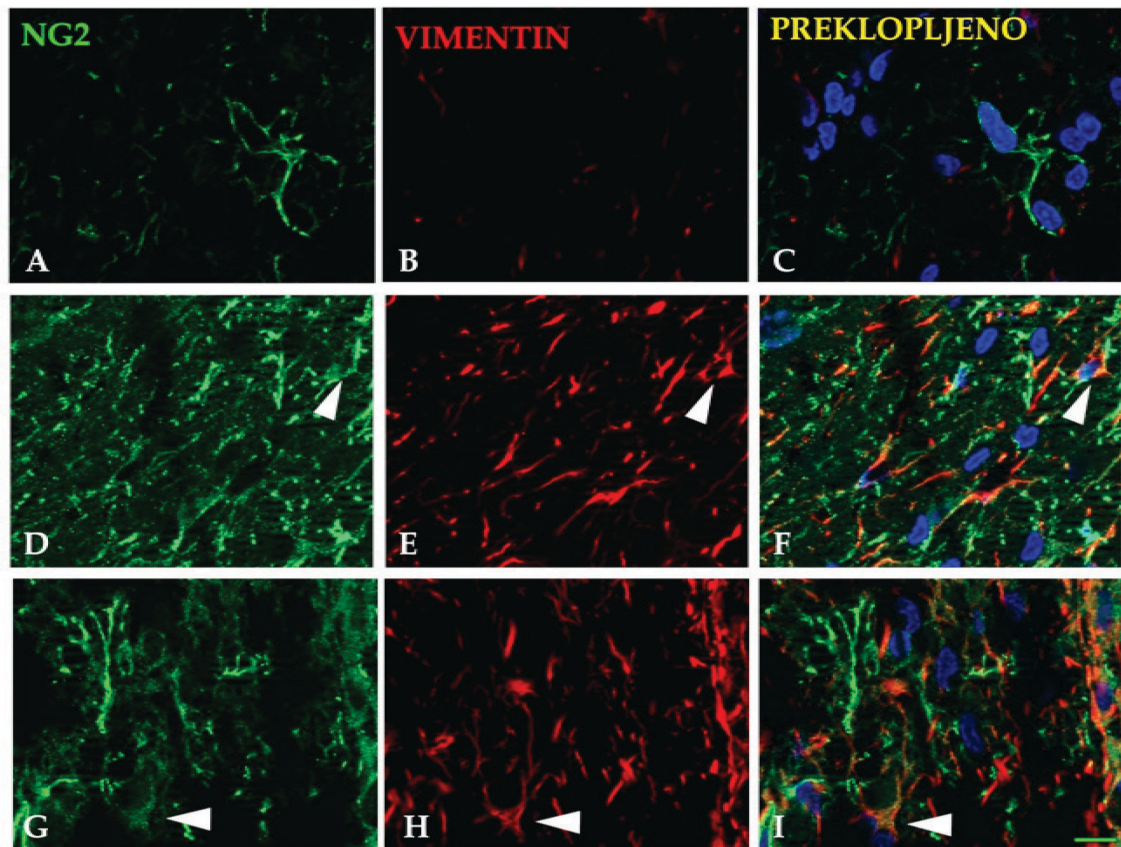
Ekspresija NG2 i vimentina u kori prednjeg mozga kontrolnih i operisanih pacova

Kod kontrolne intaktne grupe (Slika 45. A-C) mala je ekspresija vimentina u kori (Slika 45. B) i nismo uočili kolokalizaciju ispitivanih markera. Međutim, kod operisanih L životinja, kao i kod kolokalizacije sa GFAP, u delu kore oko mesta povrede mogu se uočiti sporadične ćelije (Slika 45. D-I, vrh strelice) kod kojih je utvrđena koekspresija NG2 i vimentina. Kod životinja koje

su nakon ASK primale kombinaciju svih pet B vitamina, kao i kod kontrolnih, nismo uočili kolokalizaciju ispitivanih markera (nije prikazano).



Slika 44-1. Dvojno imunofluorescentno obeležavanje NG2 (zeleno) i GFAP (crveno) u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova i 14. dana nakon ASK. Reprezentativni koronalni preseki F (A-C), L (D-O) i LK (P-S) životinja. Skala 10 μm na slikama A-C, G-I, J-L. Na ostalim slikama 50 μm .



Slika 45. Dvojno imunofluorescentno obeležavanje NG2 (*zeleno*) i vimentina (*crveno*) u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova i 14. dana nakon ASK. Repräsentationi koronalni preseći F (A-C), L (D-I). Skala 10 μ m.

4.4. EKSPRESIJA KOMPONENTI VANĆELIJSKOG MATRIKSA (ECM) NAKON POVREDE SENZOMOTORNE KORE

4.4.1. 4S i 6S Hondroitin sulfatni proteoglikani

Hondroitin sulfatni proteoglikani (CSPG) su izgrađeni od središnjeg proteinskog dela za koji su kovalentno vezani sulfatisani glikozaminoglikanski lanci (GAG). Ekspresija CSPG proteina kao i sinteza i sulfatacija vezanih GAG lanaca su značajno povećani nakon povrede CNS.

U cilju ispitivanja odgovora mozga na ablaciju senzomotorne kore ispitivali smo promene dve grupe CSPG (4S i 6S), za koje je poznato da su komponente i ECM i membrana nervnih i glijških ćelija.

4.4.1.1. Imunohistohemija 4S CSPG

Promene su praćene kod tri eksperimentalne grupe životinja: intaktne životinje (F) i životinje kojima je izvršena ablacija senzomotorne kore, a žrtvovane su 7. (L7) ili 14. dana (L14) nakon povrede.

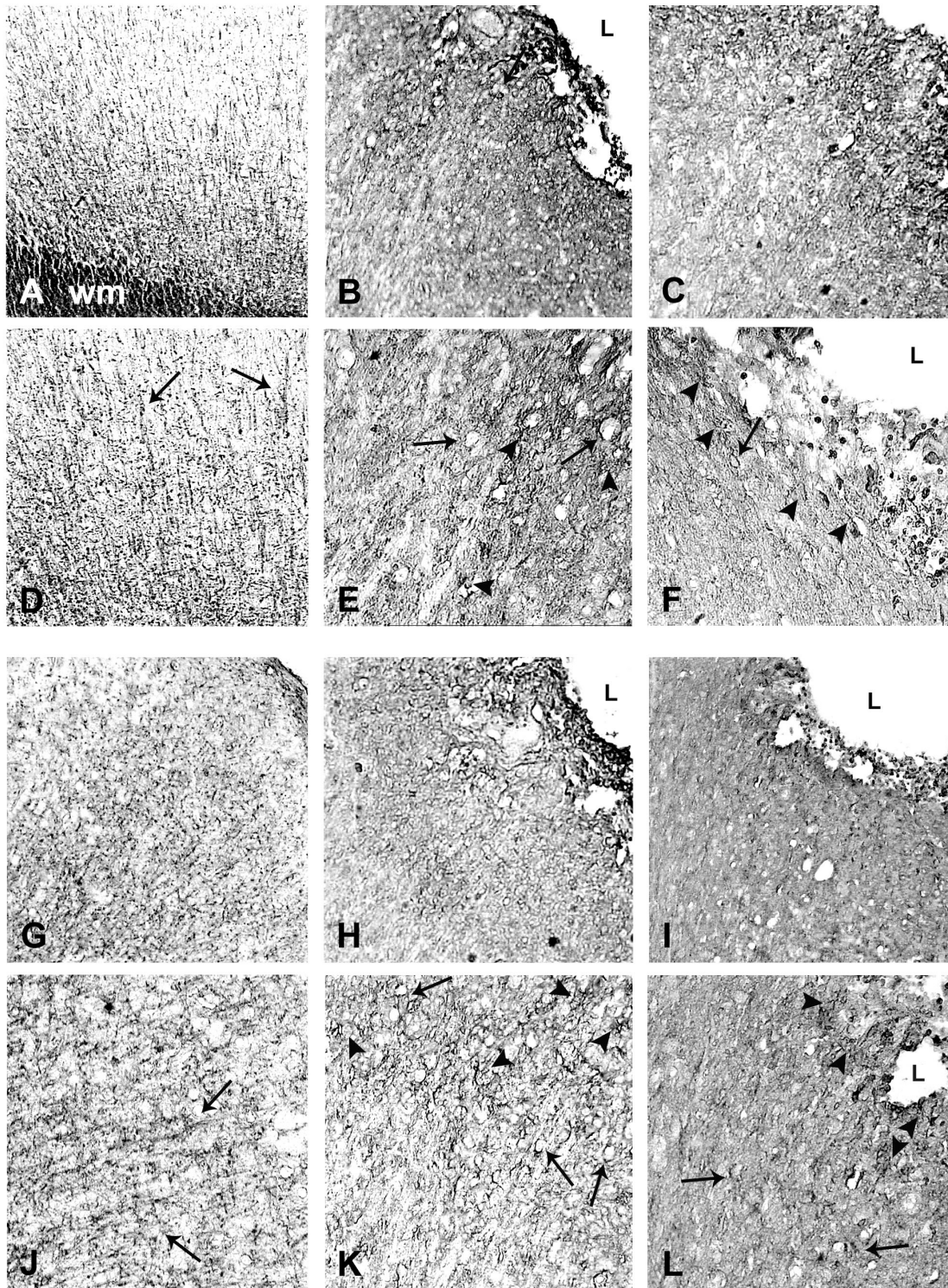
Kod kontrolnih životinja (F) konstatuje se nizak nivo ekspresije CS-4 u celoj kori mozga (Slika 46. A, D). Veća ekspresija je uočena jedino u subkortikalnoj beloju masi (Slika 46. A; bm).

Jednostrana ASK dovodi do pojaćane ekspresije CS-4 u 7. danu posle povrede (slika 46. B, E) koja se u manjoj meri zadržava i u 14. danu (slika 46. C, F). Imunobojenje je izraćenije oko mesta lezije u 7. danu i ispoljava se u zrnastoj formi na površini ćelija (slika 46. E, strelice). U 14. danu imunobojenje je više zastupljeno u ECM (slika 46. F, strelica) mozga. U okolini lezije u oba posmatrana dana obelećavanje sa CS-4 se uočava na zvezdolikim, najverovatnije glijškim ćelijama (Slika 46. E, F; crne glave strelica) i okruglim tamno obojenim ćelijama unutar lezije, verovatno limfocitima (Slika 46.).

4.4.1.2. Imunocitohemija 6S CSPG

Imunohistohemijsko bojenje 3B3 antitelom specifićnim za CS-6 pokazuje slabu ekspresiju ovog proteina u intaktnom mozgu (Slika 46. G, J). Najveći deo

tačkastog bojenja nalazi se između snopova aksona koji su usmereni ka pialnoj površini (Slika 46. J; strelica). Povreda senzomotorne kore značajno pojačava CS-6 imunobojenje u 7. danu posle lezije (Slika 46. H), a naročito u 14. danu (Slika 46. I). U 7. i 14. danu nakon povrede CS-6 imunoreaktivnost detektuje se na površini ćelijskih tela neurona u vidu otvorenih krugova (Slika 46. K, L strelice). Pored toga, i na ovim presecima vidljive su brojne dobro obojene CS-6 pozitivne zvezdolike ćelije (Slika 46. K, L; crni vrh strelice), kao i okrugle ćelije (limfociti i makrofagi?) (Slika 46. K, L).



Slika 46. Imunohistohemijsko obeležavanje CS-4 i CS-6 proteoglikana. Ekspresija 4S PG kod intaktnih kontrolnih životinja (A, D), operisanih životinja u 7. (B, E) i 14. danu (C, F). Uveličanje: A, B, C -10x; D, E, F -20x. Ekspresija 6S PG kod intaktnih kontrolnih životinja (A, D), operisanih životinja 7. (B, E) i 14. danu (C, F). Uveličanje: G, H, I -10x; J, K, L- 20x.

4.4.2. Uticaj B vitamina na ekspresiju proteoglikana fosfakana nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

4.4.2.1. Uticaj B vitamina na ekspresiju iRNK za fosfakan nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga

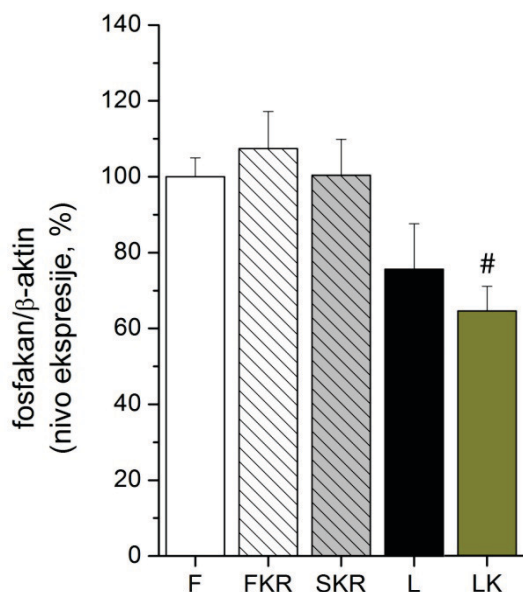
Koristili smo RT-PCR analizu da bi uporedili nivo iRNK u tkivu oko mesta povrede u 14. danu posle ablacije sa onim u tkivu izolovanom iz nepovređene kore mozga.

Ekspresija iRNK za fosfakan u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

Primena kombinacije ribavirina i svih pet B vitamina kod kontrolnih neoperisanih (FKR), kao i lažno operisanih životinja (SKR) nije dovela do značajne promene na nivou iRNK u odnosu na intaktnu kontrolu (F) (Slika 47.).

Uticaj B vitamina na ekspresiju iRNK za fosfakan nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Ekspresija ovog transkripta 14. dana nakon ASK je smanjena, ali ne statistički značajno u odnosu na kontrolni nivo. Međutim, pod uticajem tretmana koktelom svih pet B vitamina nivo iRNK za fosfakan značajno je smanjen kod LK grupe (za 36%, # $p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu vrednost. Uprkos ovakvom efektu B vitamina nema statistički značajne razlike u ekspresiji iRNK u odnosu na L grupu (Slika 47.).



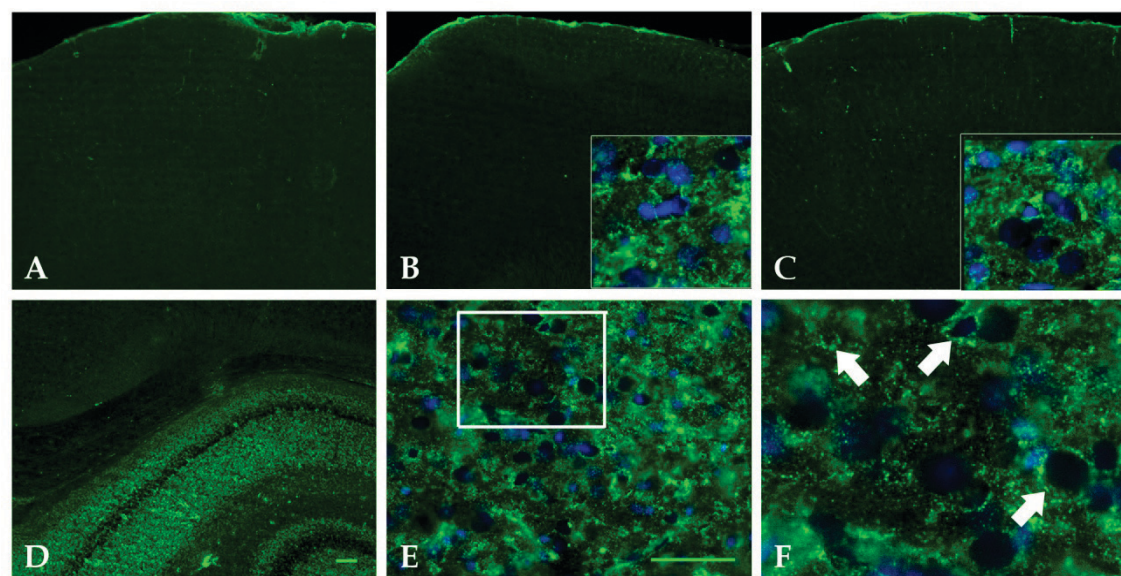
Slika 47. Ekspresija iRNK za fosfakan u desnoj kori kontrolnih i operisanih životinja. Korišćena je metoda RT-PCR analize u realnom vremenu. Vrednosti korigovane u odnosu na odgovarajuće vrednosti za β -aktin, a potom normalizovane u odnosu na fiziološku kontrolu. Rezultati u stubićima su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM; # $p < 0,05$ vs F.

4.4.2.2. Uticaj B vitamina na ekspresiju fosfakana nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Ekspresija fosfakana u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

Ekspresiju fosfakana pratili smo i imunofluorescentnim obeležavanjem koronalnih preseka mozga. Kod intaktnih kontrolnih životinja F na malom uveličanju uočava se slaba imuna reakcija na fosfakan u kori (Slika 48. A) nasuprot intenzivnom bojenju koje je primećeno u hipokampusu (Slika 48. D). Rezultati dobijeni na većem uveličanju ukazuju da je u kori fosfakan lokalizovan u vanćelijskom prostoru (Slika 48. E) i da formira tačkastu mrežu oko tela ćelija (Slika 48. F, strelice). Kod FKR i SKR životinja dobijeni rezultati na malom (Slika 48. B i C) i velikom uveličanju (Slika 48. insert B, insert C) odgovaraju onima koji su viđeni kod F grupe.

Kolokalizacija fosfakana sa GFAP-om kod F grupe pokazuje da se neki nastavci astrocита poklapaju sa imunofluorescencijom za fosfakan (Slika 49 .D, G, J, strelica).



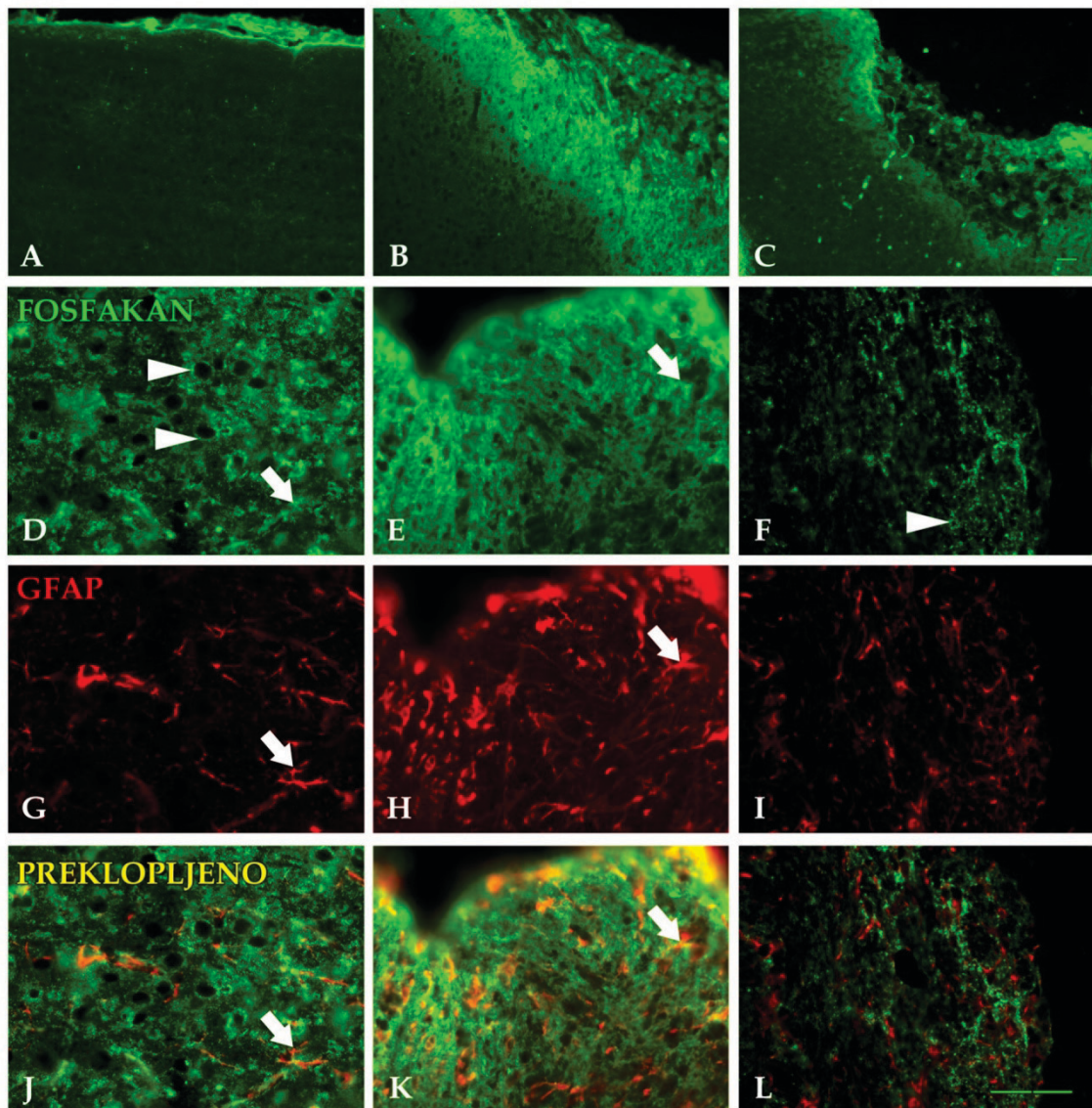
Slika 48. Dvojno imunofluorescentno obeležavanje fosfakana (zeleno) i markera jedara ćelija (DAPI, plavo) u desnoj kori prednjeg mozga kontrolnih životinja. Reprezentativni koronalni preseki mozgovna F (A, D, E, F), FKR (B) i SKR (C) životinja. Insert na B i C su 40x uveličanja. Uokvireni deo na E prikazan na F. Skala 50 μ m.

Uticaj ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova na ekspresiju fosfakana

Ablacija senzomotorne kore povećava ekspresiju proteoglikana fosfakana u širokoj zoni oko mesta lezije (Slika 49. B). Imunoreaktivnost za fosfakan uglavnom se javlja u vidu tačkaste, guste mreže u ECM (Slika 49. E), dok je kod kontrolnih životinja prisutna oko tela ćelija (Slika 49. D, vrh strelice). Dvojno bojenje sa GFAP-om pokazuje kolokalizaciju fosfakana sa mrežom astrocitnih nastavaka (Slika 49. E, H, K, strelica).

Uticaj B vitamina na ekspresiju fosfakana nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Kod životinja koje su nakon povrede tretirane koktelom svih pet B vitamina (LK) pojačano imunofluorescentno bojenje je ograničeno samo na uski prostor uz samu ivicu lezije i to uglavnom u lateralnim delovima oko mesta povrede (Slika 49.C), dok je u ostalim delovima kore intenzitet imunobojenja sličan kontrolnim presecima (Slika 49. A). Na većem uveličanju uočava se da je



Slika 49. Dvojno imunofluorescentno obeležavanje fosfakana (zeleno) i GFAP (crveno) nakon ASK i tretmana kombinacijom svih pet B vitamina. Reprerzentativni koronalni preseki mozgova F (A, D, G, J), L (B, E, H, K) i LK (C, F, I, L) životinja. Skala 50 μ m.

fosfakan lokalizovan u vanćelijskom prostoru i da formira tačkastu mrežu oko tela ćelija (Slika 49. F, vrh strelice).

Dvojno bojenje sa GFAP-om ne pokazuje kolokalizaciju proteoglikana fosfakana sa astrocitima (Slika . F, I, L).

4.4.3. Uticaj B vitamina na ekspresiju proteoglikana neurokana nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

4.4.3.1. Uticaj B vitamina na ekspresiju iRNK za neurokan nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga

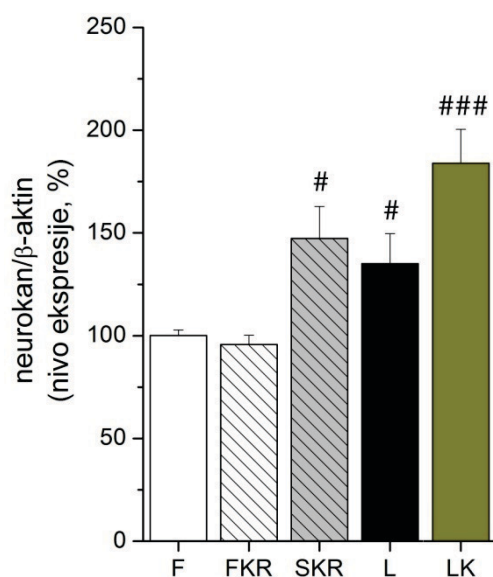
Nivo ekspresije iRNK za neurokan u kori prednjeg mozga kontrolnih i operisanih pacova je praćen metodom RT-PCR analize.

Ekspresija iRNK za neurokan u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

Tretman kombinacijom ribavirina i svih pet B vitamina kod kontrolnih neoperisanih životinja (FKR) nije doveo do promene ekspresije iRNK za neurokan u odnosu na fiziološku kontrolu (F) (Slika 50.). Međutim, kod lažno operisanih životinja (SKR) za 47% je povećan ($\#p<0,05$) nivo iRNK za neurokan u odnosu na F grupu (Slika 50.).

Uticaj kombinacije B vitamina na ekspresiju iRNK za neurokan nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

U odnosu na fiziološki nivo kod obe operisane grupe detektovano je značajno povećanje ekspresije iRNK za neurokan i to kod: L (za 35%, $\#p<0,05$) i LK (za 84%, $###p<0,005$). Primenjeni tretman B vitaminima nakon ASK povećeva ekspresiju iRNK u odnosu na L grupu, ali to povećanje nije bilo statistički značajno (Slika 50.).



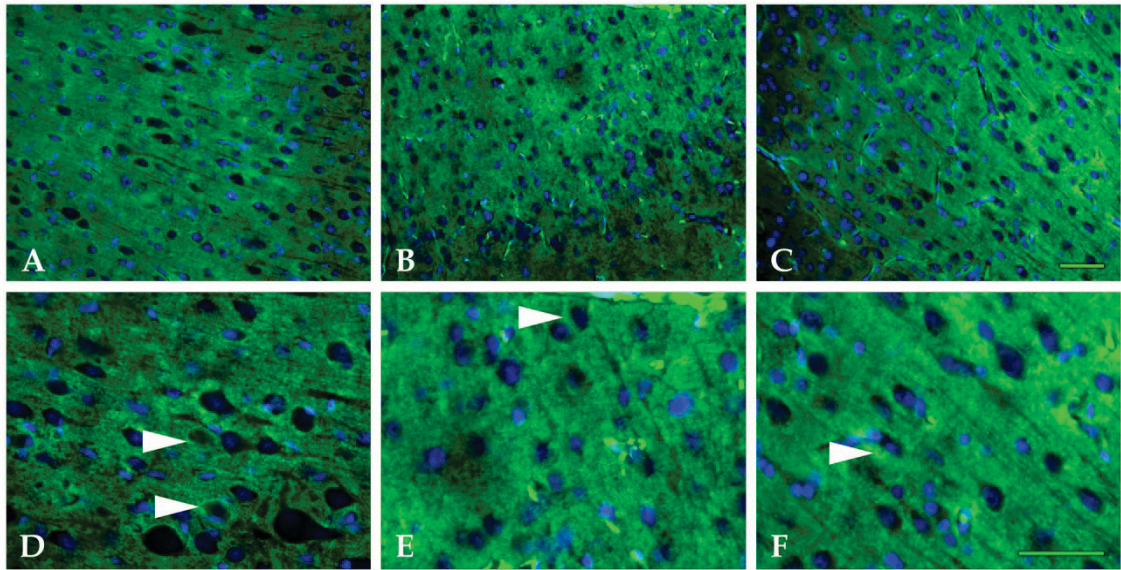
Slika 50. Ekspresija iRNK za neurokan u desnoj kori kontrolnih i operisanih životinja. Korišćena je metoda RT-PCR analize u realnom vremenu. Vrednosti su korigovane u odnosu na odgovarajuće vrednosti za β -aktin, a potom iskazane kao procenat promene u odnosu na fiziološku kontrolu F. Rezultati u stubićima su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM; # $p < 0,05$; ### $p < 0,005$; vs F.

4.4.3.2. Uticaj B vitamina na ekspresiju neurokana nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Ekspresija ovog CSPG praćena je imunofluorescentnim obeležavanjem koronalnih preseka kontrolnih i operisanih životinja.

Ekspresija neurokana u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

Kod kontrolnih F, FKR i SKR životinja uočava se ujednačen intenzitet imunobojenja na neurokan kroz koru mozga (Slika 50-1. A-C). Na većem uveličanju primetno je sporadično tačkasto bojenje oko tela ćelija (vrh strelica, Slika 50-1. D-F). Kod intaktne kontrole dvojno bojenje sa GFAP-om nije pokazalo preklapanje imunoreakcije (Slika 51. D, G, J).



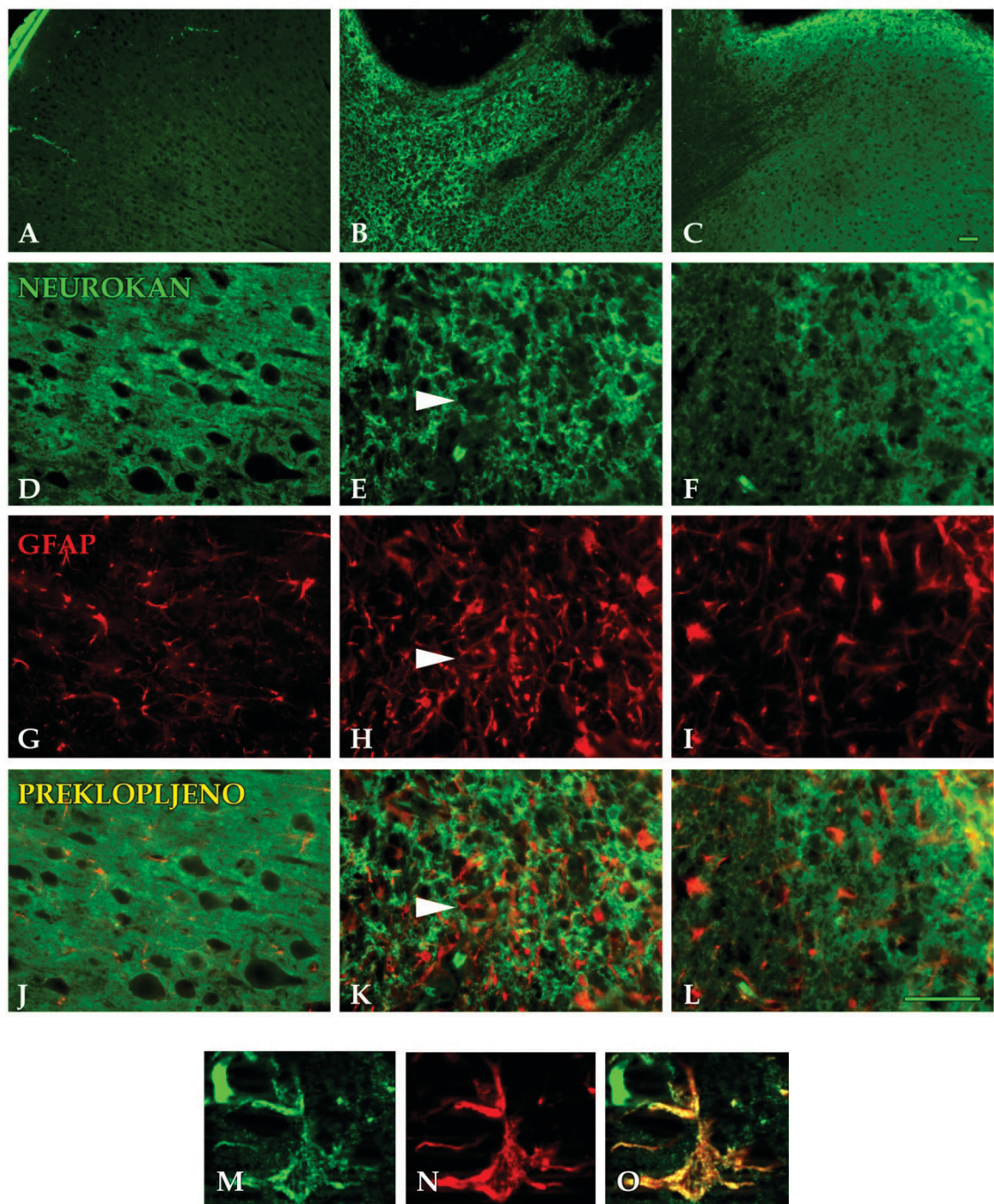
Slika 50-1. Dvojno imunofluorescentno obeležavanje neurokana (zeleno) i markera jedara ćelija (DAPI, plavo) u desnoj kori prednjeg mozga kontrolnih životinja. Reprezentativni koronalni preseki mozgova F (A, D), FKR (B, E) i SKR (C, F) životinja. Skala 50 μ m.

Uticaj ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova na ekspresiju neurokana

Nakon ablacije senzomotorne kore javlja se pojačano imunobojenje na neurokan u širokom pojasu oko mesta povrede (Slika 51. B). Imunoreakcija je prisutna u ECM u vidu bogato razgranate mreže (Slika 51. E) . Dvojno bojenje sa GFAP-om pokazuje da je neurokan uglavnom prisutan u ECM oko astrocita, a da samo sporadično postoji kolokalizacija ovog proteoglikana sa astrocitima (Slika 51. E, H, K; vrh strelice), što se posebno dobro vidi na većem uveličanju (Slika 51. M-O).

Uticaj kombinacije B vitamina na ekspresiju neurokana nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Kod životinja koje su nakon povrede tretirane koktelom svih pet B vitamina (LK) pojačano imunofluorescentno bojenje za neurokan ograničeno je samo na uski prostor oko lezije (Slika 51. C), dok je u ostalim delovima kore intenzitet imunobojenja sličan kontrolnim presecima (Slika 51. A). Na većem uveličanju uočava se da je neurokan lokalizovan u vanćelijskom prostoru i da formira tačkastu mrežu oko tela ćelija (Slika 51. F). Dvojno bojenje sa GFAP-om pokazuje da je neurokan prisutan u ECM-u oko tela astrocita (Slika 51. L).



Slika 51. Dvojno imunofluorescentno obeležavanje neurokana (zeleno) i GFAP (crveno) nakon ASK i tretmana kombinacijom svih pet B vitamina. Reprerentativni koronalni preseki mozgova F (A, D, G, J), L (B, E, H, K) i LK (C, F, I, L, M-O) životinja. Skala 50 μ m.

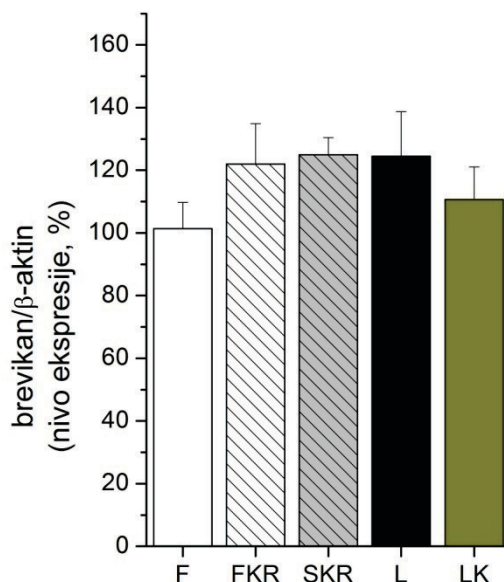
4.4.4. Uticaj B vitamina na ekspresiju proteoglikana brevikana nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

4.4.4.1. Uticaj B vitamina na ekspresiju iRNK za brevikan nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga

Nivo ekspresije iRNK za brevikan u kori prednjeg mozga kontrolnih i operisanih pacova je praćen metodom RT-PCR.

Ekspresija iRNK za brevikan u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

Primena kombinacije ribavirina i svih pet B vitamina kod kontrolnih grupa FKR i SKR nije dovela do promene na nivou iRNK u odnosu na intaktnu fiziološku kontrolu F (Slika 52.).



Slika 52. Promene u ekspresiji iRNK za brevikan u desnoj kori kontrolnih i operisanih životinja. Korišćena je metoda RT-PCR analize u realnom vremenu. Vrednosti su korigovane u odnosu na odgovarajuće vrednosti β -aktin, a potom iskazane kao procenat promene u odnosu na fiziološku kontrolu. Rezultati u stubićima su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM.

Uticaj B vitamina na ekspresiju iRNK za brevikan nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Lezija senzomotorne kore ne menja značajno ekspresiju iRNK za brevikan u odnosu na kontrolni nivo (Slika 53.). Primenjeni tretman kombinacije svih pet B vitamina (LK) posle ASK takođe ne utiču na promenu

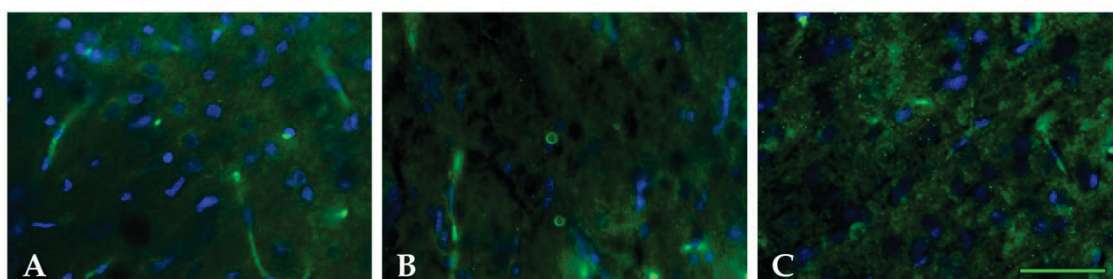
nivoa ekspresije ispitivane iRNK u odnosu na kontrolne grupe, kao ni u poređenju sa L grupom (Slika 52).

4.4.4.2. Uticaj B vitamina na ekspresiju brevikana nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Brevikan luče astrociti i neuroni. To je protein od 145 kD za koji su kovalentno vezana do tri hondroitin sulfatna lanca. Izoforma 1 je sekretovana u ECM, dok je izoforma 2 vezana za membranu. Antitelo koje je korišćeno u ovoj tezi prepoznaje izoformu 1.

Ekspresija brevikana u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

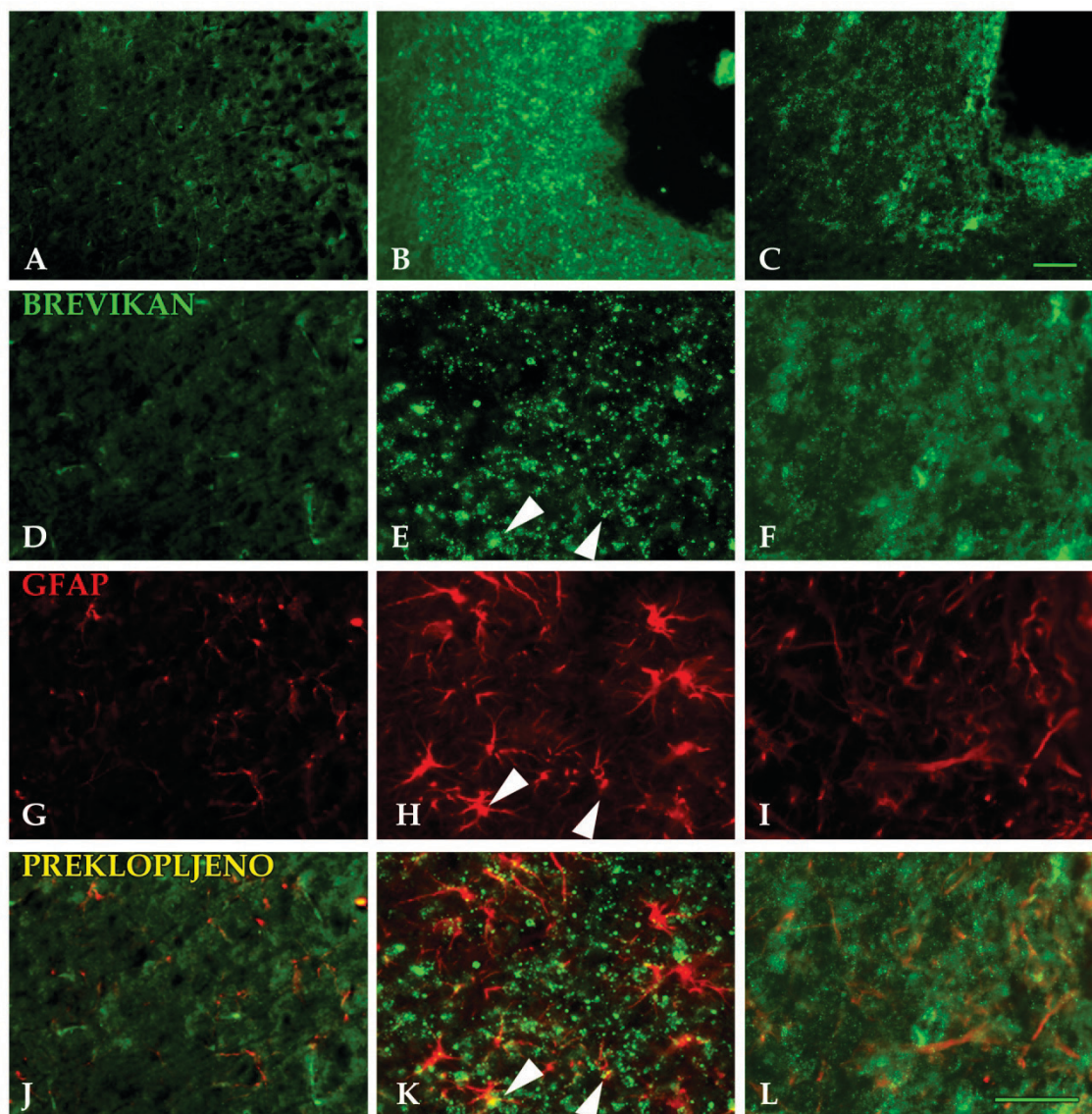
U svim kontrolnim grupama (F, FKR i SKR) primetna je ujednačena i slaba imunoreakcija na brevikan (Slika 53. A-C). Kod intaktne kontrole dvojno bojenje sa GFAP-om pokazalo je da nema preklapanja imunoreakcije (Slika 54. D, G, J).



Slika 53. Dvojno imunofluorescentno obeležavanje brevikana (zeleno) i markera jedara ćelija (DAPI, plavo) u desnoj kori prednjeg mozga kontrolnih životinja. Repräsentativni koronalni preseki mozgova F (A), FKR (B) i SKR (C) životinja. Skala 50 μ m.

Uticaj ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova na ekspresiju brevikana

Nakon ablacije senzomotorne kore primećuje se intenzivna imunoreakcija na brevikan u širokom pojasu oko mesta povrede (Slika 54. B). Nasuprot mrežastoj formi imunoreakcije koja se javlja kod dva prethodno ispitana proteoglikana, bojenje za brevikan je u vidu zrnastih loptastih nakupina (Slika 54. E). Dvojno bojenje sa GFAP-om pokazuje da je brevikan prisutan u ECM-u oko ćelija, ali i



Slika 54. Dvojno imunofluorescentno obeležavanje brevikana (zeleno) i GFAP (crveno) nakon ASK i tretmana kombinacijom svih pet B vitamina. Repräsentationi koronalni preseki mozgova F (A, D, G, J), L (B, E, H, K) i LK (C, F, I, L, M-O) životinja. Skala 50 μ m.

da dolazi do kolokalizacije ovog proteoglikana sa astrocitima (vrh strelice, Slika 54. E, H, K).

Uticaj B vitamina na ekspresiju brevikana nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Kod životinja koje su nakon povrede tretirane kombinacijom svih pet B vitamina (LK) imunofluorescentno bojenje za brevikan redukovano je na uski pojas uz samu ivicu lezije (Slika 54. C), dok je u ostalim delovima kore intenzitet

imunobojenja sličan kontrolnim presecima (Slika 54. A). Na većem uveličanju uočava se da je brevikan lokalizovan u vanćelijskom prostoru i da formira tačkastu mrežu oko tela ćelija (Slika 54. F). Brevikan u ovoj ispitanoj grupi ne pokazuje kolokalizaciju sa astrocitima (Slika 54. F, I, L) već je lokalizovan u ECM-u.

5. DISKUSIJA

Traumatska povreda mozga (TPM) vodeći je uzrok smrti i invaliditeta kod mladih odraslih osoba u razvijenim zemljama, i to je razlog za njeno intenzivno izučavanje. Iako su urađena opširna predklinička istraživanja na životinjama, sa nadom da će to omogućiti razvijanje efikasnih tretmana za TPM, ni jedan terapijski tretman nije uspešno sproveden u svakodnevnu kliničku praksu.

Primarna povreda predstavlja mehanička oštećenja nervnih puteva koja su nepovratna i to je početni događaj. Međutim, mnoge komplikacije koje se javljaju kod TPM proizilaze iz sekundarne povrede - kaskade događaja koji se nastavljaju na primarnu povredu i dovode do mnogo većeg oštećenja moždanog tkiva nego što je prvobitno izazvano. Većina tretmana koji se koriste u oporavku nakon TPM za metu imaju upravo ove sekundarne promene, ali su uglavnom usredsređene na lečenje pojedinačnih događaja kao što su ishemija, hematom, otok, neuroinflamacija, astroglioza, stvaranje slobodnih radikala ili ekscitotoksična ćelijska smrt neurona (Raghupathi, 2004). Uspešan tretman u borbi protiv TPM, koji bi delovao na više sekundarnih procesa, danas se pokušava pronaći kombinacijom različitih terapijskih tretmana. Jedan od zadataka ove teze je bio da utvrdimo da li različito kombinovanje više B vitamina, kao i B vitamina i ribavirina, deluje drugačije na oporavak nakon ablacije senzomotorne kore, nego što je to slučaj sa pojedinačnim tretmanima.

Eksperimentalni modeli su od suštinskog značaja za dalje razjašnjenje veoma složene patologije TPM i za početna (rana) testiranja potencijalnih neuroprotektivnih jedinjenja. Između ostalih u upotrebi su i životinjski modeli TPM (pogledati revijski rad O'Connor i sar., 2011). Na žalost, idealan životinjski model ne postoji. Ni jedan model TPM ne pokazuje čitav spektar patoloških promena. Ovo ograničenje proističe iz činjenice da većina modela oponaša ili fokalno ili difuzno oštećenje mozga (Buki i sar., 2009), dok je klinička stvarnost da svaki pacijent ima individualni oblik TPM koji se odlikuje različitim kombinacijama fokalne i difuzne povrede tkiva. Budući da jedan model ne

može da obuhvati čitav spektar događaja koji mogu nastati u TPM, dizajn i izbor specifičnog modela predstavlja veliki izazov za istraživače.

U ovoj tezi, kao eksperimentalni model korišćen je model ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova. Ovaj tip lezije ima nekoliko prednosti u odnosu na druge TPM modele (Goldstein, 2003): (1) lezija je lako ponovljiva - reproducibilna (Goldstein 1993); (2) lezija nastaje kao rezultat uklanjanja moždanog tkiva pa su patološka stanja kao što su upalne reakcije i gliozna redukovane (Pearlson i Robinson, 1981; Szele i sar., 1995); (3) veličina lezije i propratne promene ponašanja su najveće na početku; (4) patološki procesi vezani za sekundarnu povredu su smanjeni na minimum u odnosu na druge tipove povreda npr. ishemije (Pulsinelli i sar., 1982).

Traumatske povrede mozga mogu dovesti do senzornih, motornih i kognitivnih poremećaja, kako kod ljudi, tako i u životinjskim modelima TPM (Narajan i sar., 2002; Saatman i sar., 2008). Jedan od važnih ciljeva eksperimentalnih istraživanja TPM je da se povežu ćelijski mehanizmi koji dovode do post-traumatske disfunkcije i smrti ćelija sa uočenim deficitima u ponašanju. Međutim, razlike u složenosti anatomskih puteva koji su u vezi sa kognitivnim i motornim funkcijama, otežavaju korelaciju zapažene promene ponašanja kod ljudi sa onima ostvarenim u manjim životinjama. Dakle, potrebno je da se izaberu testovi ponašanja koji su relativno lako izvodljivi u laboratoriji, ponovljivi i koji se lako tumače (revijski rad Fujimoto i sar., 2004), a njihovi rezultati mogu da doprinesu razumevanju tih procesa kod ljudi.

Vestibulomotorni testovi su dizajnirani da rasvetle finu motornu koordinaciju i idealni su za merenje funkcionalnog oporavka u eksperimentalnim modelima TBI. Oni oponašaju svakodnevne aktivnosti pacijenata, kao što su ravnoteža, koordinacija i hodanje. Povreda senzomotorne kore dovodi do poremećaja motorike i problema u prednjim i zadnjim ekstremitetima. Jedan od najčešće korišćenih testova ponašanja koji se koriste kod poremećaja motorike zadnjih ekstremiteta je test prelaska preko grede (BW)(Feeney i sar., 1982; Goldstein i Davis, 1990; Goldstein, 1993). To je test koji

smo koristili i u ovoj tezi. Podrazumeva određivanje broja omašaja (nepravilnog postavljanja šapice na gredu) zadnjeg ekstremiteta (kontralateralnog u odnosu na mesto TPM) i ocenjivanje prelaska životinja preko grede (Feeney i sar., 1982; Goldstein i Davis, 1990; Goldstein, 1993; Soblosky i sar., 1996; Baskin i sar., 2003; Brkić i sar., 2012). BW test je bio prvi test korišćen u eksperimentima TPM kod glodara (Dixon i sar., 1987), osetljiv je na težinu povrede i farmakološke manipulacije kod različitih modela TPM. Pokazao se posebno koristan u testiranju efekata lekova na oporavak ljudi posle moždanog udara (Goldstein, 2000).

5.1. UTICAJ RAZLIČITIH KOMBINACIJA B VITAMINA I RIBAVIRINA NA OPORAVAK LOKOMOTORNE FUNKCIJE NAKON POVREDE PREDNJEG MOZGA PACOVA

Fokalna jednostrana lezija senzomotorne kore obično ne prouzrokuje značajna smanjenja lokomocije zadnjih ekstremiteta pri hodu na ravnoj površini (Gentile i sar., 1978). Međutim, promene u hodu postaju očigledne kada životinje moraju da pređu usku gredu (Gentile i sar., 1978). Merenje sposobnosti pacova da prelaze usku gredu se pokazalo kao posebno koristan test za utvrđivanje oporavka koordinacije lokomotorne aktivnosti zadnjeg ekstremiteta (BW test). Ponovljena merenja ovakvog ponašanja tokom vremena obezbeđuju jednostavan način za kvantifikaciju stepena lokomotornog oporavka i predstavljaju pogodan test za ispitivanje mogućih strategija lečenja. Da bi se što preciznije odredio uticaj povrede mozga i primenjenih tretmana na oporavak motornih funkcija rezultati testiranja su prikazani na dva načina: kao ukupna ocena prelaska i kao procenat omašaja zadnjeg kontralateralnog ekstremiteta tokom prelaska preko grede. Analiza dobijenih rezultata pokazuje da procenat omašaja bolje odražava fine promene u koordinaciji lokomocije nego ukupna ocena, što je u skladu sa literaturnim podacima (Stanley i sar., 2005).

Zastupljenost zadnjih ekstremiteta u kori pacova je lokalizovana na medijalnom delu temene kore (Hall i Lindholm, 1974). U našoj studiji ovaj deo kore bio je uklonjen metodom usisne ablacije. Jednostrano oštećenje senzomotorne kore (SMK) je koristan eksperimentalni model za istraživanje ćelijskih mehanizama koji su u osnovi sinaptičkih rearanžmana nakon TPM. Prethodne studije pokazuju da jednostrano oštećenje delova SMK odgovornih za lokomociju zadnjih ekstremiteta dovodi do deficita u korišćenju kontralateralnog ekstremiteta (Schallert i sar., 2000).

Poznato je da lokomotorni deficiti, koji prate moždanu traumu u humanoj populaciji, predstavljaju jedan od najvećih problema, ne samo zdravstvenih već i socioekonomskih. Jedan od zadataka ove doktorske teze je

bio da se utvrdi da li ribavirin i B vitamini mogu doprineti oporavku lokomotornih funkcija nakon TPM.

5.1.1. Motorna koordinacija kod kontrolnih grupa životinja

Intaktne životinje koje nisu prošle ni operaciju ni tretman ispitivanim supstancama (FK grupa) su u svim posmatranim vremenima imale slične rezultate koji nisu odstupali od onih dobijenih u predtreningu. Sve životinje su imale mali broj omašaja levog zadnjeg ekstremiteta i postizale su na testu slične ocene koje su bile bliske maksimalnim vrednostima.

I kod kontrolnih grupa tretiranih kombinacijom svih pet B vitamina i ribavirina (FKR, SKR) dobijeni su slični rezultati. To upućuje na zaključak da tretman B vitaminima i ribavirinom ne utiče na lokomotornu sposobnost intaktnih i lažno operisanih pacova. Naši rezultati su u skladu sa literaturnim. Pokazano je da pojedinačna *i.p.* primena ribavirina samo u velikim dozama (0,5 do 1,5 g/kg) utiče na ponašanje (De Sarro i sar., 1990), a da pojedinačna *i.p.* primena u malim dozama (10, 20 ili 30 mg/kg) ne dovodi do značajnih promena bazalnog motornog ponašanja i da nema efekta na motorni odgovor zdravih, adultnih pacova (Janać i sar., 2005).

5.1.2. Uticaj ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova na lokomotornu koordinaciju

Delovi senzomotorne kore koji su odgovorni za zadnje ekstremitete uklonjeni su ablacijom. Ova metoda se često koristi u eksperimentima (Goldstein i Davis, 1990; Goldstein, 1993; Soblosky i sar., 1997, Brkić i sar., 2012) jer omogućava da lako kontrolišemo veličinu lezije i početni motorni deficit u zadnjim šapama. Oporavak motornih funkcija pratili smo BW testom (Feeney i sar., 1982; Goldstein i Davis, 1990; Goldstein, 1993). Najčešće se koristi sistem bodovanja koji su razvili Feeney i saradnici (1982). Međutim, u ovoj tezi korišćena je modifikovana skala (Clifton i sar., 1991; Ohlsson i Johansson, 1995) koja se pokazala bolja za uočavanje malih, finih promena koje se dešavaju nakon ASK.

U 2. danu nakon ablacije senzomotorne kore dolazi do značajnog pada lokomotornih funkcija što je predstavljeno povećanim brojem omašaja kontralateralnog zadnjeg ekstremiteta. U narednim danima kod ove grupe životinja primetno je poboljšanje motorike, ali do kraja posmatranog perioda (14. dan) konačan skor nije dostigao vrednost ostvarenu pre povrede. Poznato je da pacovi sa povredama ili ASK pokazuju spontan oporavak lokomotornih funkcija u narednim nedeljama, sa potpunim oporavkom do 30-tog dana nakon povrede (Soblosky i sar., 1996, 1997; Hoane i sar., 2006 a, b, 2008; Goffus i sar., 2010; Brkić i sar., 2012; Lavrnja i sar., 2013, u štampi). Međutim, iako su netretirane operisane životinje u grupi L postigle zavidan stepen oporavka senzomotorne integracije 14. dana nakon TPM, njihovi rezultati su u odgovarajućim posmatranim vremenima bili značajno lošiji u odnosu na rezultate ostvarene u grupama koje su posle ablacije primale B vitamine, ribavirin ili njihov koktel.

5.1.3. Efekat B vitamina na lokomotornu koordinaciju nakon ablacije senzomotorne kore

Izučavanje ćelijskih i molekularnih mehanizama koji su u osnovi nastajanja patofizioloških pojava u traumatskoj povredi mozga i kičmene moždine, omogućilo je da se identifikuju potencijalna ciljna mesta za delovanje supstanci koje bi mogle da imaju terapijski potencijal. Pokazano je da vitamini iz grupe B daju dobre rezultate u predkliničkim biheviornalnim i histološkim ispitivanjima na animalnim modelima TPM (Betz i sar., 1994; Hoane i sar., 2003, 2006, 2008; Belenky i sar. 2007; Quigley i sar., 2009). S obzirom na to da tretmani pojedinačnim supstancama ne blokiraju sve moguće procese koji se javljaju u sekundarnoj povredi, istraživači su počeli da kombinuju terapije za efikasnije lečenje. Kombinovani tretmani B2 i B3 vitamina pokazali su dobre efekte kod MELAS sindroma (*eng- mitochondrial encephalomyopathy lactic acidosis and stroke*). Rađeni su i eksperimenti u kojima su ispitivane kombinacije više različitih jedinjenja i praćena je njihova sposobnost da poboljšaju oporavak nakon TPM (Hoane i sar., 1997; Scholler i sar., 2004), kao npr. efekat magnezijuma i B2

vitamina na oporavak nakon kontuzione povrede kore (CCI) (Barbre i Hoane, 2006).

U ovoj tezi su ispitivani uticaji različitih kombinacija B vitamina: B1 + B6 + B12 (LK1); B2 + B3 (LK2); B1 + B2 + B3 + B6 + B12 (LK) na oporavak nakon TPM. Pokazano je da se u 2. danu nakon povrede, kada je najveće smanjenje lokomotorne koordinacije, uticaj ovih različitih kombinacija bitno razlikuje. Tako, kombinacija LK1 nema efekta, dok LK2, a naročito LK, statistički značajno smanju broj omašaja prilikom izvođenja BW testa. Ovakav trend se zadržava i u ostalim vremenskim tačkama.

Životinje tretirane koktelom svih pet B vitamina (LK grupa) imale su značajno manji broj omašaja na BW testu u poređenju sa L grupom i postigle su bolje ocene u svim posmatranim danima. Statistički značajno poboljšanje lokomocije, u odnosu na L grupu, primećeno je i u LK2 grupi gde je tretman podrazumevao primenu samo B2 (7,5 mg/kg/dan) i B3 vitamina (500 mg/kg/dan).

Nalazi drugih studija potvrđuju neke naše rezultate. Tako, pokazano je da B3 ima neuroprotektivni efekat kod ishemija (Klaidman i sar., 1996; Ayoub i sar., 1999; Mokudai i sar., 2000; Sakakibara i sar., 2000, 2002; Maynard i sar., 2001; Ayoub i Maynard, 2002) i TPM (Hoane i sar., 2003, 2006a,b; Belenky i sar. 2007; Quigley i sar., 2009). Primena 500 mg/kg B3 vitamina 15 minuta i 24 sata nakon CCI poboljšava oporavak, kao i postignute rezultate senzomotornog testa (*eng-bilateral tactile adhesive removal*) i radnu memoriju na Morrisovom vodenom lavirintu (Hoane i sar., 2003). U modelu FPI (*eng-fluid percussion injury*) dve aplikacije B3 (u koncentraciji od 50 ili 500 mg/kg) primenjene u prvih 24 sata nakon lezije dovode do oporavka senzomotornih funkcija, a veća doza poboljšava i kognitivni oporavak do 35. dana posle povrede (Hoane i sar., 2006a). Primena B3 vitamina nakon CCI u trajanju od 12 dana u istoj dozi od 500 mg/kg dala je različite rezultate u zavisnosti od početka tretmana. Primenom u 4. satu nakon povrede dobijeni rezultati na testovima motornog ponašanja u 14. danu bili su isti kao kod sham kontrolnih životinja. Početak

tretmana u 8. satu nakon CCI omogućuje bolje izvođenje testova u odnosu na netretirane operisane životinje, ali rezultati ne dostižu nivo lažno operisane kontrole (Hoane i sar., 2008). Imajući u vidu ove podatke, u našim eksperimentima smo započinjali sa tretmanom B vitaminima 15 min nakon završetka operacije. Najbolji rezultati su dobijeni kontinuiranim sedmodnevnim tretmanom niskom dozom B3 (50 mg/kg), što značajno poboljšava lokomotorne funkcije do 28. dana nakon CCI (Goffus i sar., 2010). Nedavni radovi opisuju višestruke mehanizme delovanja vitamina B3 i ukazuju na antioksidativne aktivnosti na nivou mitohondrija, PARP inhibicije i neuroprotekcije preko sitruin receptorskog sistema (Chong i Maiese, 2008; Maiese i sar, 2009).

Poznato je da vitamin B2 smanjuje pojavu otoka nakon ishemije mozga (Betz i sar., 1994). Studija koja je prva ukazala na terapijski potencijal vitamina B2 u lečenju TPM objavljena je 2005 godine. Hoane i saradnici su pokazali da B2 u koncentraciji od 7,5 mg/kg (koju smo i mi koristili) primenjen *i.p.* 15. minuta i 24. sata nakon CCI smanjuje veličinu lezije, umanjuje pojavu edema i poboljšava motorni oporavak.

Kao što je već rečeno, primetili smo da postoji razlika u savladavanju BW testa među samim tretiranim grupama. Tako je u grupi LK1 primena B1, B6 i B12 vitamina nakon ablacije dovela do poboljšanja motorike, ako se prati procenat omašaja u različitim vremenima nakon lezije. Međutim, njihov ukupan skor nije bio bolji od L grupe, a bio je značajno slabiji u odnosu na LK i LK2 grupu.

Nedostatak vitamina B6 može da dovede do ishemije, pojave otoka, produkcije slobodnih radikala, neurotoksičnosti i kognitivnih oštećenja (Cabrini i sar., 1998; Bender, 1999; Cuskelli i sar., 2001; Friso i sar., 2004). Budući da su ovakvi problemi uočeni i posle povreda mozga, pretpostavka da bi povećanje koncentracije B6 vitamina nakon TPM moglo da ima neuroprotektivni efekat potvrđena je delovanjem aktivne forme B6 (piridoksal 5-fosfat) u dozama od 200 do 1200 mg/kg u ishemiji (Hwang i sar., 2007). Nedavno je pokazano da dve aplikacije B6 vitamina nakon CCI (30 minuta i 24 h), u dozi od 300 ili 600

mg/kg dovodi do dozno-zavisnog oporavka lokomotornih funkcija (Kuypers i Hoane, 2010). Uočeno je da dugotrajna primena velikih doza (od 200 mg/kg) B6 izaziva neuropatije (Perry i sar., 2004), pa za razliku od drugih B vitamina njegova doza mora biti pažljivo odabrana.

Vitamin B12 deluje kao kofaktor metionin sintaze koja metiliše homocistein do metionina, pa manjak ovog vitamina dovodi do povećanja ukupnih serumskih koncentracija homocisteina. Vitamin B12 također deluje kao kofaktor metilmalonil-CoA mutaze koja prevodi metilmalonil-CoA u sukcinil-CoA. B6 i B12 u kombinaciji sa folnom kiselinom poboljšavaju učenje i memoriju kod pacova nakon ishemije (Huang i sar., 2007).

Iako pojedinačna primena B1, B6 i B12 vitamina poboljšava motorni odgovor nakon TPM, kombinacija ta tri B vitamina u ovoj tezi nije dovela do značajnog poboljšanja motorne koordinacije nakon ASK u odnosu na L životinje.

5.1.4. Efekat ribavirina i kombinovanog tretmana B vitamina i ribavirina na motornu koordinaciju nakon ablacije senzomotorne kore

U LR grupi u 2. i 3. danu zabeležen je sličan procenat omašaja kao kod L, što je bilo očekivano budući da je tretman ribavirinom započet tek od 3. dana. U 6. danu, pa do kraja posmatranog perioda tretman ribavirinom je značajno smanjio procenat omašaja na BW testu u poređenju sa L grupom u odgovarajućem posmatranom vremenu. Takođe, LR životinje su ostvarile i veće ocene u 6. i 8. danu. Treba napomenuti da iako LR životinje u 14. danu nisu bile značajno bolje u izvođenju BW testa od onih u L grupi, nisu se razlikovale od LKR grupe koja je statistički znatno uspešnija na testu nego L grupa.

Ribavirin pokazuje umeren afinitet za A1 receptore (Franchetti i sar., 1996). Amfetamin je aktivator dopaminergičkog sistema prednjeg mozga i uzrokuje dozno-zavisne biohemijske efekte, kao i promene ponašanja pacova (Sharp i sar., 1987; Seiden i sar., 1993). Predtretman ribavirinom u sve tri doze (10, 20 ili 30 mg/kg) odlaže početak amfetaminom indukovano

hiperlokomotornog odgovora, dok primena dve veće doze ribavirina značajno smanjuje ovaj odgovor. Ribavirin smanjuje amfetaminom indukovanu lokomotornu aktivnost preko efekata koje vrši na centralnu dopaminergičku neurotransmisiju (Janać i sar., 2005).

Kod životinja koje su primale kombinaciju B vitamina i ribavirina (LKR) treba imati u vidu da su ove životinje primale dva dana samo koktel svih 5 ispitivanih B vitamina, a tek od 3. dana i ribavirin. Kod ove grupe je takođe primetno značajno poboljšanje motorike ($*p < 0,05$) u odnosu na L grupu u svim posmatranim danima, što je potvrđeno smanjenjem broja omašaja kao i boljim dobijenim ocenama. Međutim, ako se uporede efekti ova tri tretmana (LK, LR i LKR) nema statistički značajnih razlika, što ukazuje da kombinacija ribavirina i svih pet B vitamina nije imala dodatni efekat na oporavak lokomotornih funkcija kod ASK pacova.

5.2. UTICAJ TRETMANA RAZLIČITIM KOMBINACIJAMA B VITAMINA I RIBAVIRINA NA ODGOVOR NEURONA NAKON POVREDE MOZGA

Citoskelet neurona pokazuje niz sličnih promena nakon različitih tipova povreda mozga i kod mnogih neurodegenerativnih bolesti. Pored toga, povreda mozga dovodi do propadanja neurona, prekidanja mnogih neuronskih veza i puteva unutar i između pojedinih regiona mozga, što u krajnjem sledu rezultira značajnim neurološkim deficitom, koji zavisi od mesta i veličine povrede. Imajući to u vidu, jedan od ciljeva ove disertacije bio je da se imunohistochemijskom metodom ispita uticaj B vitamina i ribavirina na promenu ekspresije neuronalnih markera nakon ASK.

5.2.1. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na izrastanje i grananje neurita nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

5.2.1.1. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju GAP-43 proteina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

GAP-43 je fosfoprotein bogato zastupljen tokom sinaptogeneze u konusima rasta i presinaptičkim membranama (Benowitz i Perrone-Bizzozero, 1991). Nakon sinaptogeneze smanjuje se njegovo prisustvo u većini regiona mozga osim u delovima u kojima se plastičnost zadržava i u adultnom dobu. U neokorteksu pacova najviši nivo ekspresije zabeležen je u prve dve nedelje posle rođenja, što se poklapa sa periodom terminalnog grananja aksona i formiranjem sinapsi (Jacobson i sar., 1986; Oestreicher i Gispen, 1986; McGuire i sar., 1988; Meberg i Routtenberg, 1991; Dani i sar., 1991; Holtmaat i sar., 1995). Zatim se nivo iRNK i proteina znatno smanjuje što je pokazano u primarnim senzornim i motornim zonama (Benowitz i sar., 1989). Određene populacije neurona nastavljaju da eksprimiraju visok nivo GAP-43 i kod adulta, npr. limbički sistem i asocijativne zone (Jacobson i sar., 1986; Oestreicher i Gispen, 1986; McGuire i sar., 1988; Meberg i Routtenberg, 1991; Dani i sar., 1991).

Naši rezultati imunohistohemijskog bojenja GAP-43 proteina u mozgu kontrolnih životinja pokazali su zrnasto bojenje u neuropilu ravnomerno raspoređeno kroz koru što je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima (Gispen i sar., 1985; Benowitz i sar., 1989; Mercken i sar., 1992). Međutim, postoje i drugačiji podaci o distribuciji GAP-43 u adultnom mozgu. Masliah i saradnici (1991) uočili su imunoreaktivnost u citoplazmi kod 40% piramidnih neurona kore. Uočene razlike verovatno nastaju zbog primene različite metodologije i upotrebe drugačijih antitela.

Na presecima kontrolnih grupa životinja koje su primale kombinovanu terapiju B vitamina i ribavirina (FKR i SKR) nisu uočene razlike u ekspresiji GAP-43 proteina u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu na osnovu čega se može načelno zaključiti da primenjeni tretmani ne menjaju ekspresiju GAP-43 kod životinja koje nisu pretrpele leziju.

Do sada objavljeni podaci o sudbini GAP-43 proteina nakon povrede CNS idu u obe krajnosti. Dok neki autori pokazuju da povreda smanjuje nivo ekspresije ovog proteina u odnosu na kontrolne vrednosti kod intaktnih životinja (Masliah i sar., 1991; Hulsebosch i sar., 1998; Lončarević-Vasiljković i sar., 2012), u drugim slučajevima uočena je prekomerna ekspresija oko mesta lezije. Npr, nakon perkusione povrede mozga, tokom početne regeneracije, dolazi do značajnih modifikacija citoskeleta u oštećenim aksonima i povećanja ekspresije GAP-43 (Christman i sar., 1997). Takođe, ablacija senzomotorne kore pojačava ekspresiju ovog proteina oko mesta povrede (Stroemer i sar., 1995; Benowitz i Routtenberg, 1997; Christman i sar., 1997; Brkić i sar., 2012). Rezultati dobijeni u ovoj tezi ukazuju na pojačanu imunoreakciju u delovima kore oko mesta povrede, kao i veliki broj GAP-43 pozitivnih ćelija. Neke od ovih ćelija su loptasti, zadebljali, intenzivno obojeni (verovatno distrofični) neuroni grupisani neposredno uz ivicu lezije. Primećuje se intenzivna imunoreakcija u citoplazmi neurona, a smanjena je okoloćelijska zrnasta forma bojenja prisutna kod kontrolnih životinja. Pored toga, u delu kore oko mesta lezije, naročito u beloj masi neposredno ispod povrede, uočavaju se intenzivno obojene ćelije sa jasno definisanim nastavcima koje izgledaju kao reaktivni astrociti. I radovi drugih autora sugerišu da je ekspresija GAP-43 nakon povrede izražena kod ćelija na kojima se odvijaju procesi grananja karakteristični za reaktivne astrocite i aktivnu mikrogliju/makrofage (Vitkovic i sar., 1988; da Cunha i Vitkovic, 1990; Moretto i sar., 1995; Brkic i sar., 2012). Ishemija povećava ekspresiju GAP-43 u GFAP pozitivnim Milerovim ćelijama (Dijk i sar., 2007). U toku razvica i nakon povrede eksprimira se GAP-43 iRNK u glijskim ćelijama u beloj masi i to u astrocitima (de la Monte i sar., 1995) i Švanovim ćelijama (Benowitz i Routtenberg, 1997).

U literaturi nema podataka o efektu tretmana pojedinačnim B vitaminima, ribavirinom ili njihovom kombinacijom na ekspresiju GAP-43 proteina nakon ablacije senzomotorne kore. U ovoj doktorskoj tezi pokazali smo po prvi put da tretmani B vitaminima i ribavirinom menjaju ekspresiju GAP-43

nakon ablacije senzomotorne kore. Tako kod LK2 i LR životinja pojačana je imunoreakcija u kori neposredno oko lezije, pozitivna reakcija u citoplazmi javlja se samo u nekoliko sporadičnih ćelija, a nije primećeno bojenje glijških ćelija. Kod LK1, a naročito kod LK i LKR grupa još je veća ekspresija praćenog proteina, imunoreakcija se detektuje u celoj ipsilateralnoj kori kao zrnasto bojenje neuropila, a zahvata i belu masu.

5.2.1.2. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju NF-H, SMI-31 i neurodegeneraciju nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

Traumatske povrede mozga dovode do gubitka brojnih citoskeletnih proteina, uključujući MAP2 (Hicks i sar., 1995, 1997; Posmantur i sar., 1996a; Folkerts i sar., 1998; Saatman i sar., 1998), α -spektrin (Saatman i sar., 1996; Posmantur i sar., 1997), NF-L i NF-H (Posmantur i sar., 1994, 1997, 2000; Saatman i sar., 1998). Povreda uzrokuje povećan ulazak kalcijuma u neurone koji potom pokreće celu kaskadu događaja. Između ostalog, aktivira se kalpain (Kampfl i sar., 1996; Saatman i sar., 1996; Posmantur i sar., 1997), a eksperimentalno je pokazano da je upravo aktivacija ove kalcijum zavisne proteaze glavni razlog propadanja citoskeletnih proteina nakon TPM (revijski radovi Kampfl i sar., 1997; Saatman i sar., 1998). Povećan unutarćelijski nivo kalcijuma aktivira i kalcineurin, kalcijum zavisnu fosfatazu koja defosforiliše bočne lance neurofilamenata (Büki i Povlishock, 2006).

Neurofilamenti su neuron specifični intermedijarni filamenti građeni od NF-L subjedinice za koju su vezane NF-M i NF-H subjedinice (Julien i Mushynski, 1998). Dva teža NF proteina, naročito NF-H, su izrazito fosforilisani u aksonu, a slabo u telu i dendritima (Cohen i sar., 1987; Gotow i sar., 1992, 1995). Poremećaji u ovim citoskeletnim proteinima imaju posledice po strukturu i funkciju neurona.

U ovoj tezi pokazano je da tretman ribavirinom i B vitaminima ne menja obrazac ekspresije NF-H kod kontrolnih životinja. Imunoreakcija na NF-H prisutna je u celoj kori, gde se intenzivno boje tela nervnih ćelija i njihovi

nastavci. Međutim, nakon ASK smanjuje se intenzitet bojenja u svim slojevima kore osim neposredno oko lezije gde se uočavaju izrazito obojeni i isprekidani, zadebljali aksoni. Imunohistohemijska istraživanja drugih autora pokazala su da TPM dovode do značajnog smanjenja NF-L, NF-H i MAP2 imunoreaktivnosti u telima neurona, kao i u dendritima, u prvih 24 h nakon povrede i opstaje nedeljama potom (Posmantur i sar., 1996 a, b; Hicks i sar., 1997; Saatman i sar., 1996, 1998). Dobijeni rezultati su potvrđeni i WB analizom kada je pokazan gubitak NF proteina (Posmantur i sar., 1994, 1997).

Tretmani B vitaminima nakon ASK menjaju obrazac bojenja NF-H uočen kod operisanih životinja. Dovode do smanjenog nakupljanja NF-H oko mesta lezije, dok je imuno reakcija u ostatku kore slična kontrolnim. Najizraženiji efekat ima primena B2 i B3 vitamina nakon ASK.

Izmenjena građa NF negativno utiče na preživljavanje oštećenih neurona (Galvin i sar., 2000). Pokazano je da TPM dovodi do smanjene stope fosforilacije NF (Posmantur i sar., 1998; Chen i sar., 1999) što povećava osetljivost NF na proteolizu (Pant, 1988; Greenwood i sar., 1993; Raabe i sar., 1996). Istraživano je kako kinaze i fosfataze doprinose oštećenju citoskeletnih elemenata nakon TPM i zna se da trauma može dovesti do narušavanja ravnoteže u aktivnosti pomenutih enzima (Yang i sar., 1993; Dash i sar., 1995) što dovodi do nenormalne fosforilacije ili defosforilacije NF. Da bismo utvrdili da li promene NF koje se dešavaju nakon povrede u CNS opstaju i u 14. danu nakon ASK, izabrali smo procenu NF-H proteina jer je najviše fosforilisan od svih NF. Huh i saradnici su 2002. godine pokazali da se imunoreaktivnost na NF-H smanjuje već u prvim minutama posle fokalne TPM.

Nakupljanje fosforilisanih NF je obeležje raznih neurodegenerativnih stanja: Alchajmerove bolesti, amiotrofičke lateralne skleroze, Parkinsonove bolesti itd (Gold i sar., 1991; Liu i sar., 2011), a primećeno je i kod životinja sa eksperimentalnim povredama CNS. Agregati fosforilisanih NF su pronađeni u ćelijskim telima i proksimalnim delovima aksona (jer je narušen aksonalni transport), dok u fiziološkim uslovima NF je lokalizovan samo u distalnim

delovima aksona (Shea i sar., 2009). Proteolitička razgradnja NF može biti blokirana povećanom fosforilacijom ovih proteina (Goldstein i sar., 1987; Pant, 1988). Povećano nakupljanje fosforilisanih NF može da bude citotoksično i da dovede do neadekvatnih interakcija sa drugim citoskeletnim elementima (Zhou i sar., 2010). Pokazano je da NF inhibiraju polimerizaciju mikrotubula (Bocquet i sar., 2009), a povećana fosforilacija NF smanjuje njihovu interakciju i direktno povećava polimerizaciju mikrotubula. Ovakva patološka organizacija NF doprinosi neurodegeneraciji. Iz degenerisanih neurona oslobađaju se fosforilisani NF u ECM, i njihov povećan nivo može se detektovati pre pojave kliničkih simptoma povrede, pa se koriste kao rani biomarkeri (Petzold, 2005; Brettschneider i sar., 2006).

Koristili smo imunobojenje na SMI-31 antitelo, koje obeležava fosforilisane epitope NF-M i NF-H, da ispitamo efekat primenjenih tretmana na fosforilaciju NF. Nasuprot intenzivnoj imunoreakciji koja je obeležila aksone u svim slojevima kore kod kontrolnih životinja, nakon ASK intenzivno bojenje uočljivo je samo oko lezije koja indukuje specifičnu akumulaciju fosforilisanih NF u formi loptastih proširenja, "perlica", na intenzivno obojenim zadebljalim nastavcima. Sličan obrazac bojenja abnormalnih struktura neurona viđen je i u radovima drugih autora (King i sar., 2001; Bjelobaba i sar., 2010). Ispitivanje ultrastrukturne organizacije uočenih loptastih proširenja pokazalo je da sadrže organele pomešane sa NF (King i sar., 2000). B vitamini i ribavirin menjaju opisanu situaciju nakon ASK. Oko mesta lezije samo se sporadično javljaju intenzivno obeleženi isprekidani aksoni. Loptaste agregacije fosforilisanih NF su retke i manjih dimenzija.

Za obeležavanje degenerisanih neurona koristili smo bojenje Fluorožadom B (FJB). Nakon lezije na presecima prednjeg mozga uočava se mali broj degenerisanih neurona što i nije neobično budući da se radi o 14. danu nakon ASK. Dosadašnje studije su pokazale da je broj degenerisanih neurona 3. dana nakon lezije veći nego 10. dana nakon ubodne kortikalne povrede (Parabucki i sar., 2012), odnosno da je broj degenerisanih neurona u kori

prednjeg mozga maksimalan u prva tri dana nakon povrede (Sato i sar. 2001). Kod životinja koje su nakon ablacije SMK tretirane B vitaminima i ribavirinom nisu primećene ćelije koje su se bojile FJB. Iz literature je poznato da primena B3 vitamina u dozi od 500 mg/kg smanjuje apoptozu i ima neuroprotektivni efekat (Hoane i sar., 2006a; 2006b; Holland i sar., 2008). Pokazano je da primena B3 nakon TPM redukuje aktivnost kaspaze-3 (Feng i sar., 2006) i smanjuje ćelijsku smrt (Holland i sar., 2008; Hoane i sar., 2006a) verovatno preko inhibicije PARP-a (poli (ADP-riboza) polimeraza) (Yang i sar., 2002).

Na nekim presecima mozga nakon ASK uočene su FJB⁺ zvezdaste ćelije u zonama kore neposredno uz povredu. Dvojnim bojenjem sa GFAP proteinom, markerom astrocita, pokazano je da su ove zvezdaste ćelije, koje su FJB⁺/GFAP⁺ u stvari reaktivni astrociti. Naši rezultati su našli potvrdu u literaturi. Pokazano je da se FJB može koristiti za obeležavanje aktivirane mikroglije i astrocita u toku hroničnih degenerativnih procesa kao što je Alchajmerova bolest (Damjanac i sar., 2007).

5.2.1.3. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju MAP2 proteina nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova

MAP2 je neophodan za stabilnost mikrotubula i plastičnost neurona. Među citoskeletnim proteinima jedan je od najosetljivijih na promenjene uslove do kojih dovodi povreda u CNS. Naime, pokazano je da se smanjenje MAP2 imunobojenja uočava već u prvim minutima (Huh i sar., 2003) i satima (Furutani i Kibiyashi, 2012) nakon povrede, što ga čini ranim markerom neuronalnog oštećenja nakon TPM. U adultnom mozgu MAP2 imunoreaktivnost je prisutna samo u telu i dendritima neurona (De Camilli i sar., 1984). To je potvrđeno i u ovoj tezi. Analizom preseka mozga intaktnih životinja MAP2 imunobojenje lokalizovano je na telu i dendritima neurona u svim slojevima kore prednjeg mozga.

Različite povrede CNS dovode do značajnih promena morfologije dendrita (bubrenje dendrita, gubitak trnolikih spinova) čemu je prethodilo smanjenje imunoreakcije na MAP2. Naime, TPM preko aktivacije kalpaina i

povećane proteolize MAP2 proteina, odnosno aktivacijom kalcineurina i smanjenom fosforilacijom MAP2, dovode do gubitka MAP2, što indukuje depolimerizaciju mikrotubula (Halpain i Greengard, 1990; Li i sar., 2000; Hoskison i Shuttleworth, 2006). Ovakvo narušavanja strukture mikrotubula primećeno je nakon ishemije (Akulinin i Dahlstrom, 2003), hroničnog subduralnog krvarenja (Furutani i Kibayashi, 2012), TPM (Hoskison i sar., 2009), povreda kičmene moždine (Li i sar., 2000).

U skladu sa navedenim literaturnim podacima pokazali smo da nakon ASK dolazi do gubljenja imunobojenja za MAP2 protein u telu neurona, a da se uz leziju uočavaju zrnasto obojeni isprekidani dendriti. Furutani i Kibiyashi su pokazali da pored redukcije MAP2 imunobojenja i smanjenja broja MAP2 pozitivnih ćelija dolazi i do smanjenja broja dendritskih trnova na piramidalnim neuronima. To ukazuje na promene u sinaptičkoj komunikaciji u kortikalnim krugovima.

Iako B vitamini i ribavirin nisu menjali ekspresiju ovog citoskeletnog proteina u odsustvu lezije, to se menja nakon povrede. Naime, kod svih tretiranih grupa primetno je očuvanje obrasca ekspresije MAP2 slično onom kod kontrolnih životinja. Intenzivno se boje tela ćelija u celoj ipsilateralnoj kori i dendriti, čak i uz samu leziju.

U nekim radovima je pokazano da može doći do prolaznog povećanja imunoreaktivnosti na MAP1B u kori i hipokampusu od 24 sata do sedam dana nakon TPM (Emery i sar., 2000). Budući da je MAP1B uključen u izduživanje aksona povećana ekspresija ovog proteina može ukazivati na plastičnost ili prolazni regenerativni odgovor nakon povrede mozga. Pored toga nekoliko studija ukazuje na vezu između povećane ekspresije GAP-43 proteina u delovima kore odgovornim za kontrolu motornih aktivnosti prednjih i zadnjih šapa sa stepenom oporavka izgubljenih motornih funkcija (korišćeni su razni testovi ponašanja među kojima je i BW test) (Dixon i sar., 1987; Hulsebosch i sar., 1998). Imajući ovo u vidu možemo pretpostaviti da povećana ekspresija GAP-43 i MAP2 proteina doprinosi bržem oporavku motornih funkcija nakon

ASK kod grupa tretiranih koktelom B vitamina i ribavirinom. Iz ovih rezultata proizilazi da primenjena terapija promoviše rast aksona i grananje dendrita u cilju stvaranja novih neuronskih veza i ponovnog uspostavljanja prekinutih neuronskih krugova. To dalje dovodi do smanjenja motornog deficita uzrokovanog povredom i omogućuje postizanje boljih rezultata na BW testu. S druge strane, treba imati u vidu i činjenicu da grananje neurona nakon povrede i uspostavljanje novih veza može dovesti do povećanih epileptičnih aktivnosti neurona (McKinney i sar., 1997). Međutim, u našim eksperimentima nismo konstatovali pojavu konvulzija ni kod jedne od testiranih životinja.

5.2.2. Uticaj različitih kombinacija B vitamina i ribavirina na ekspresiju markera sinaptogeneze

Oporavak funkcije nakon TPM je izuzetno ograničen. Neuspeh oporavka motornih funkcija pripisuje se ograničavanju rasta aksona i sinaptičke plastičnosti (Ramic i sar., 2006). Da bismo ispitali efekat B vitamina i ribavirina na procese sinaptogeneze posle lezije senzomotorne kore urađeno je imunobojenje sinaptofizina, markera presinaptičke plastičnosti i sinaptogeneze (Ujike i sar., 2002).

5.2.2.1. Ekspresija sinaptofizina u kori prednjeg mozga kontrolnih pacova

Sinaptofizin je kalcijum-vezujući glikoprotein, molekulske mase od 38 kDa, lokalizovan u membranama presinaptičkih vezikula neurona (Wiedenmann i Franke, 1985; Navone i sar., 1986; Südhof i sar., 1987). Rutinski se koristi kao marker za određivanje broja sinapsi tokom neuroanatomskog remodelovanja (sinaptička plastičnost) ili nakon povrede (Brock i O'Callaghan, 1987; Meng i sar., 2006), i kao marker funkcionalnosti mozga (Masliah i sar., 1989).

Praćenje smanjenja nivoa sinaptofizina pokazalo je da je stepen gubitka sinapsi u cerebralnoj kori povezan sa progresijom simptoma kod pacijenata sa Alchajmerovom bolesti (Callahan i sar., 2002; Ingelsson i sar., 2004), koja je vodeći uzrok demencije kod starijih osoba. Takođe, traumatske povrede mozga dovode do promene količine i distribucije sinaptofizina (D'Ambrosio i sar., 1998; Shojo i Kibayashi, 2006). Pokazano je da dolazi do gubitka sinapsi povezanih sa oštećenim aksonima i do narušavanja sinaptičke plastičnosti (Scheff i sar., 2005; Semchenko i sar., 2006), što dovodi do poremećaja u ponašanju.

Kod kontrolnih adultnih životinja koje nisu prošle nikakav tretman imunobojenje je gotovo ravnomerno raspoređeno kroz koru. Vidljivo je difuzno, zrnasto bojenje između neurona kao i zrnaste nakupine oko tela neurona, dok u

subkortikalnoj beloj masi nije primećena reakcija. To su potvrdili i nalazi drugih autora (Shojo i Kibayashi, 2006; Brkic i sar., 2012).

Rezultati imunoreakcije koje smo dobili nakon ASK pokazuju pojačanje intenziteta bojenja na sinaptofizin oko mesta povrede. Shojo i Kibayashi su pokazali da se imunoreaktivnost povećava u delu kore oko mesta lezije i u subkortikalnoj beloj masi (bez promene nivoa proteina u ipsilateralnoj hemisferi) i da je intenzitet reakcije proporcionalan veličini lezije i vremenu proteklom nakon povrede. Objašnjenje može biti ili povećana sinaptogeneza ili neurodegeneracija. Međutim, ako dobijene rezultate povežemo za rezultatima FJB bojenja, koji ukazuju na prisustvo degenerisanih neurona oko mesta lezije, možemo da zaključimo da je povećano imunobojenje na sinaptofizin nakon ASK rezultat nagomilavanja sinaptofizina. Do nagomilavanja sinaptofizina dolazi zbog inhibicije transporta sinaptičkih vezikula što ukazuje na disfunkciju sinapsi i degeneraciju nastavaka neurona (Shojo i Kibayashi, 2006).

Tretmani B vitaminima i ribavirinom, kao i njihovom kombinacijom dovode do izrazitog povećanje imunoreaktivnosti u širem regionu oko mesta povrede i subkortikalnoj beloj masi. Ranije prikazano povećanje GAP-43 i MAP2 imunoreakcije nakon upotrebe ovih supstanci, brži oporavak motornih funkcija nakon povrede, uz negativno bojenje FJB, više ukazuje na sinaptogenezu, podržavajući ideju nekih autora o regeneraciji neurona (Stroemer i sar., 1992; Chou i sar., 2002) i neuroplastičnosti. Naši rezultati po prvi put pokazuju da B vitamini, ribavirin i njihova kombinacija povećavaju sinaptičku plastičnost nakon ASK.

5.3. UTICAJ RAZLIČITIH KOMBINACIJA B VITAMINA I RIBAVIRINA NA ODGOVOR GLIJSKIH ČELIJA NAKON POVREDE MOZGA

Većina aksona CNS-a adulta ne uspeva da se regeneriše nakon traumatskih povreda (Fitch i Silver 2008). Regeneracija je neuspešna zbog slabog kapaciteta za oporavak neurona u CNS-u, ali i zbog nastanka glijskog ožiljka koji inhibira izrastanje aksona. Glijski ožiljak sadrži gustu mrežu hipertrofiranih nastavaka astrocита, brojne ćelijske elemente uključujući oštećene oligodendrocite, aktiviranu mikrogliju, OPC, meningealne ćelije, vaskularne endotelijalne ćelije kao i molekule ECM-a, najčešće CSPG (Chen i sar., 2002; Galtrey i Fawcett, 2007; Sherman i Back, 2008). Zreli glijski ožiljak čine uglavnom reaktivni astrociti pa se svaka regeneracija CNS-a odvija u sredini ispunjenoj ovim ćelijama. Procesi koji utiču na hipertrofiju i hiperplaziju astrocита u glijskom ožiljku su pogodna mesta za terapijske intervencije, koje bi poboljšale preživljavanje neurona i potpomogle ponovno izrastanje neurita. Pronalaženje novih terapijskih pristupa u cilju da se ograniči glijski ožiljak i omogući oporavak funkcija nakon povreda CNS-a je jedan od ciljeva rada mnogih laboratorija.

Međutim, ustaljeno mišljenje o glijskom ožiljku samo kao inhibitoru regeneracije aksona danas se menja. Molekularne tehnike manipulacije genima omogućile su istraživanje funkcije reaktivnih astrocита i uloge glijskog ožiljka. Reaktivni astrociti su nađeni na granici zdravog i oštećenog tkiva. Ograničavanjem mesta lezije astrociti doprinose održavanju jonske homeostaze, transporta vode, uklanjaju vanćelijski glutamat i slobodne radikale, učestvuju u produkciji citokina i hemokina, faktora rasta (Rolls i sar., 2009; Sofroniew, 2009). Ablacija ovih ćelija narušava formiranje ožiljnog tkiva i dovodi do širenja inflamatornih ćelija u zdravo tkivo, neuspeha oporavka narušene KMB, jačeg oštećenja tkiva i povećanja veličine lezije, većeg gubitka nervnih ćelija i demijelinizacije, pogoršanja kliničke slike i smanjenog oporavka povredom

izgubljenih funkcija (Bush i sar., 1999; Faulkner i sar., 2004; Sofroniew, 2005; Voskuhl i sar., 2009). Studije na transgenim miševima pokazale su da ekspresija GFAP-a nije neophodna za normalno funkcionisanje većine astrocita u zdravom mozgu ovih miševa, ali da je neophodna u procesu reaktivne astroglioze i za formiranje glijskog ožiljka (Pekny i sar., 1995; Pekny i Pekna, 2004; Herrmann i sar., 2008). Naime, pokazano je da je kod nokaut životinja za GFAP i vimentin redukovana astroglioza i povećana regeneracija aksona (Wilhelmsson i sar., 2004; Pekny i Nilsson, 2005), ali i da se povećava veličina lezije i pogoršavaju simptomi kod EAE i nakon ishemija (Liedtke i sar., 1998; Li i sar., 2008).

Svi navedeni, ali i mnogi drugi, u neku ruku oprečni rezultati, ukazuju na kompleksnu ulogu reaktivnih astrocita: kao inhibitora izrastanja aksona i glavnog krivca za neuspeh oporavka nakon povreda CNS-a, do druge krajnosti u kojoj ima zaštitnu funkciju i pospešuje oporavak. Koju će od ovih uloga astrociti igrati zavisi od vremenskog perioda nakon povrede i treba znati u kojim vremenskim prozorima je najbolje intervenisati.

Kao što je rečeno, nakon povreda u CNS-u astrociti, mikroglija i glijske progenitorske ćelije se aktiviraju i povećavaju svoju brojnost oko mesta lezije. Odmah nakon povrede rezidentni astrociti uvećavaju telo (hipertrofija), izdužuju nastavke (već u prvim satima nakon povrede; Sibson i sar., 2008) i pojačavaju ekspresiju GFAP proteina i vimentina. Pokazano je da glijske progenitorske ćelije generišu reaktivne astrocite (Yoshioka i sar., 2012) i doprinose povećanju broja ovih ćelija oko mesta lezije.

Iako mnogi zreli astrociti u zdravom tkivu CNS-a ne ekspimiraju nivo GFAP-a koji može biti otkriven, za identifikaciju reaktivnih astrocita GFAP je pouzdan marker. Pored toga, za identifikaciju reaktivnih astrocita koriste se i glutamin sintetaza i S100B (Norenberg i Martinez-Hernandez, 1979; Gonçalves i sar., 2008), ali ovi markeri nisu ekspimirani samo u ovim ćelijama. Vimentin je ekspimiran u astrocitima u toku razvića da bi u adultnom mozgu bio zamenjen GFAP-om. Ponovna ekspresija vimentina u reaktivnim astrocitima čini ga pouzdanim markerom ovih ćelija.

U ovoj tezi koristili smo GFAP, vimentin i S100B protein da utvrdimo da li tretmani B vitaminima i ribavirinom nakon ASK dovode do promene u morfologiji i broju reaktivnih astrocita, kao i u ekspresiji njihovih karakterističnih proteina.

Imunohistohemijskim bojenjem (IHC) uočena je intenzivna ekspresija GFAP i vimentina, kao i povećanje broja GFAP⁺ i vimentin⁺ astrocita u širokom obodu oko mesta lezije 14. dana nakon ASK. Reaktivni astrociti karakteristične morfologije, sa kraćim i debljim nastavcima i hipertrofiranim telom učestvuju u formiranju glijskog ožiljka i potpuno ograničavaju mesto povrede. Analizom tkiva kore prednjeg mozga pacova nakon ablacije RT-PCR i Western blot (WB) metodom detektovali smo statistički značajno povećanje iRNK za GFAP i vimentin kao i samih proteina. Dobijeni rezultati su u skladu sa dosadašnjim istraživanjima iz ove oblasti. Pokazano je da nivo povećanja genske ekspresije praćenih proteina zavisi od tipa lezije što ukazuje da je vrsta povrede važna determinanta reaktivnosti astrocita (Burbach i sar., 2004). Odgovor astrocita zavisi i od regiona mozga koji je oštećen, što ukazuje da proces astroglioze može biti modulisan faktorima prisutnim u post-traumatskom mozgu (Hill i sar, 1996).

Pronalaženje novih terapijskih pristupa u cilju ograničavanja štetnog efekta glijskog ožiljka i omogućavanje oporavka funkcija nakon povreda CNS-a je jedan od ciljeva rada mnogih laboratorija. Pokazano je da neki farmakološki tretmani koji se koriste u predkliničkim studijama umanjuju posledice koje se javljaju nakon TPM i imaju neuroprotektivno dejstvo u različitim tipovima lezija (Saatman i sar., 2008; Vink i Nimmo, 2009). Iz literature je poznato da primena B2 i B3 vitamina nakon TPM statistički značajno smanjuje veličinu lezije, redukuje ekspresiju GFAP-a i reaktivnu astrogliozu oko mesta povrede (Ayoub i sar., 1999; Mokudai i sar., 2000; Sakakibara i sar., 2000, 2002; Maynard i sar., 2001; Ayoub i Maynard, 2002; Hoane i sar., 2003, 2005, Quigley i sar., 2009). Takođe, poznato je da purinski nukleotidi regulišu izrastanje neurona, proliferaciju glijskih ćelija, sintezu i oslobađanje neurotrofičkih faktora, a imaju

značajnu ulogu i u aktivaciji mikroglije i astrocita i formiranju ožiljnog tkiva. Mogu da indukuju proliferaciju astrocita pacova, dovode do promene u obliku ćelije i povećavaju ekspresiju GFAP-a i vimentina kao i elongaciju ćelijskih nastavaka (Rathbone i sar., 1999). U cilju inhibicije sinteze purinskih nukleotida i modulisanja glijskog ožiljka može se koristiti ribavirin, koji je analog guanozina, a koji smanjuje proces reaktivne astroglioze nakon povrede mozga (Peković i sar., 2005, 2006) i u EAE (Lavrnja i sar., 2012). Mehanizam delovanja ribavirina je složen. On inhibicijom enzima IMPDH (Franchetti i Grifantini, 1999) sprečava konverziju IMP u XMP i na taj način smanjuje nivo guanilata (GMP, GDP, GTP i dGTP) u ćeliji, usled čega dolazi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G0/G1 međufazi (Vallée i sar., 2000) i inhibicije proliferacije. Pošto je GTP neophodan kao kofaktor za konverziju IMP u AMP, smanjuje se i nivo adenilata. Ribavirin ostvaruje svoje dejstvo i vezivanjem za adenozijske receptore, delujući kao selektivni agonist adenozijskih A1 receptora (Franchetti i sar., 1996). Stoga se može pretpostaviti da ribavirin, delujući kao analog A1 adenozijskih receptora, inhibira adenilat ciklazu i produkciju cAMP, sprečavajući na taj način fosforilaciju nishodnih proteina u ERK1/2 signalnom putu, što smo i pokazali u našem ranijem radu (Peković i sar., 2006). Imajući u vidu da se ERK/MAPK intezivno aktiviraju u reaktivnim astrocitima, kao i da je njihova aktivacija neophodna za indukciju i održavanje reaktivnog fenotipa astrocita, može se pretpostaviti da je to jedan od mehanizama kojim ribavirin dovodi do redukcije reaktivne astroglioze i sprečava formiranje glijskog ožiljka, što smo zapazili i u ovoj tezi. Ovaj njegov efekat je dodatno pojačan u kombinaciji sa B vitaminima.

S druge strane, imajući u vidu da reaktivni astrociti mogu da imaju i neuroprotektivni efekat posebno u prvim satima i danima nakon povrede, jer kontrolišu inflamaciju, oslobađaju neuroprotektivne i neurotrofičke molekule i pomažu u očuvanju jonske homeostaze u oštećenim regionima mozga (Fawcett i Asher, 1999; Wang i sar., 2008; Buffo i sar., 2010), tretman ribavirinom je započinjan tek od trećeg dana posle lezije. U našem prethodnom radu (Peković

i sar., 2005) tretman ribavirinom, nakon ASK, primenjivan je u dužini od 5 i 10 dana. Pokazano je da već i 5 tretmana dovodi do smanjenja reaktivne astroglioze, dok je nakon 10 tretmana taj efekat ribavirina još više bio izražen, tako da je u ovoj doktorskoj tezi primenjen taj protokol.

Iako, u odnosu na kontrolne životinje, povreda povećava gensku i proteinsku ekspresiju GFAP i kod grupa koje su tretirane ispitivanim supstancama, naši rezultati pokazuju da primena različitih kombinacija B vitamina i ribavirina različito moduliše odgovor astrocita nakon ASK. Rezultati RT-PCR i WB analize statistički su značajno smanjeni samo kod životinja koje su primale koktel svih 5 vitamina. S druge strane, na IHC nivou sve primenjene kombinacije menjaju nivo ekspresije GFAP proteina u astrocitima u zoni povrede i dovode do morfoloških promena na ovim ćelijama. Naime, reaktivni astrociti nakon primenjenih tretmana imaju manje reaktivnu formu i više nalikuju astrocitima kod kontrolnih životinja.

Isti obrazac genske i proteinske ekspresije nakon ASK i tretmana ispitivanim supstancama uočen je i kod vimentina, intermedijarnog filameta nezrelih astrocita koji je ponovo eksprimiran u reaktivnim astrocitima. Na nivou IHC analize uočene promene u ekspresiji vimentina u astrocitima, kao i smanjenje broja vimentinom obeleženih ćelija, još su izraženije nego što je slučaj sa GFAP-om.

Kao što je poznato, S100B je protein koji vezuje kalcijum, proizvode ga uglavnom astrociti i njegova koncentracija se značajno povećava nakon TPM, najverovatnije usled destrukcije astrocita (Rothermundt i saradnici, 2003). Kako je pokazano da je njegova ekspresija u korelaciji sa veličinom povrede, preživljavanjem i neurološkim ishodom S100B se koristi kao jedan od biomarkera TPM (Dash i sar., 2010).

Između ostalog S100B ima ulogu i u modifikaciji citoskeleta, proliferaciji, diferencijaciji i migraciji astrocita, kao i u regulaciji njihove morfologije (Rothermundt i sar., 2003, Brozzi i sar., 2009). U našim eksperimentima, dvojnim imunofluorescentnim bojenjem pokazali smo da se nakon ASK njegova

ekspresija značajno povećava u reaktivnim GFAP⁺ astrocitima oko mesta lezije. Sva tri tretmana (koktel svih pet B vitamina, ribavirin i njihova kombinacija) dovode do značajnog smanjenja ekspresije S100B i to sa sledećom efikasnošću LKR >> LR > LK. Do sada u literaturi nema podataka o delovanju B vitamina i ribavirina na ekspresiju S100B proteina, tako da su ovo prvi rezultati koji ukazuju na to da ovi tretmani mogu da modulišu ekspresiju ovog proteina.

Praćenjem ekspresije GFAP-a, vimentina i S100B proteina u astrocitima životinja tretiranih različitim kombinacijama B vitamina i ribavirina, pokazali smo da svi ispitivani tretmani dovode do značajnog smanjenja broja reaktivnih astrocita oko mesta povrede i menjaju njihovu morfologiju ka mirujućoj formi.

Skorašnji rezultati nekih autora (McTigue i sar., 2001; Chen i sar., 2002) pokazuju da povreda CNS stimuliše NG2 ćelije da se dele i akumuliraju oko mesta povrede (Levine i sar., 1993; Levine, 1994; Barnabe´-Heider i sar., 2010; Komitova i sar., 2011) i zajedno sa mikroglijom i astrocitima formiraju glijski ožiljak. Rezultati prikazani u ovoj tezi ukazuju na pojavu masovne akumulacije NG2 ćelija u širokom pojasu oko mesta lezije koja je smanjena primenom svih 5 B vitamina.

Rezultati prikazani u ovoj tezi pokazuju da se primenom B vitamina i ribavirina nakon ASK redukuje proces reaktivne glioze, smanjuje proliferacija reaktivnih astrocita i NG2 ćelija oko mesta lezije i smanjuje ekspresija markera ovih ćelija: GFAP-a, vimentina, S100B proteina i NG2. Tim se otvaraju vrata efikasnijoj regeneraciji nervnog sistema, izrastanju aksona, sinaptogenezi i sledstveno tome oporavku izgubljenih funkcija.

5.4. EKSPRESIJA KOMPONENTI VANĆELIJSKOG MATRIKSA (ECM) NAKON POVREDE SENZOMOTORNE KORE

Već je prethodno rečeno da povrede nervnog sistema aktiviraju mikrogliju, astrocite i OPC i dovode do povećanja produkcije CSPG (Fitch i Silver, 1997; Fitch i sar., 1999; Rhodes i sar., 2006). CSPG inhibiraju izrastanje neurita *in vitro* (Hynds i Snow, 1999; Snow i sar., 2001) i sprečavaju regeneraciju aksona *in vivo* (Zhang i sar., 2001). Međutim, nisu kod svih CSPG isti mehanizmi uključeni u ove procese. Proteoglikani NG2 (Dou i Levine, 1994) i versikan - V2 izoforma (Schmalfeldt i sar., 2000) inhibiraju izrastanje aksona preko proteinskih delova, dok brevikan i neurokan za ostvarivanje istog cilja zahtevaju prisustvo GAG lanaca (Yamada i sar., 1997). U toku sazrevanja CNS-a i nakon povreda menja se nivo ekspresije središnjeg proteina CSPG (Dobbertin i sar., 2003; Tang i sar., 2003) i obrazac sulfatacije CS-GAG lanaca (Properzi i sar., 2005; Gilbert i sar., 2005; Nandini i Sugahara, 2006). U fiziološkim uslovima najzastupljeniji GAG je CS-4 (Flaccus i sar., 1991; Gilbert i sar., 2005), dok je u ožiljnom tkivu najprisutniji CS-6 GAG (McKeon i sar., 1991; Gilbert i sar., 2005) i detektuje se značajno povećana ekspresija CS-4,6 (Gilbert i sar., 2005). Eksperimenti *in vitro* pokazali su da najveći inhibitorni uticaj na rast aksona ima CS-4,6 (Gilbert i sar., 2005), dok CS-2,6 promoviše rast embrionalnih neurita *in vitro* (Nadanaka i sar., 1998).

U ovoj doktorskoj tezi ispitali smo ekspresiju dva različito sulfatisana GAG: CS-4 i CS-6. Kod kontrolnih životinja detektuje se slična ekspresija ova dva CS-GAG. Najveći deo tačkastog bojenja lokalizovan je između snopova aksona koji su usmereni ka pialnoj površini, a uočena je intenzivna ekspresija CS-4 i u subkortikalnoj beloj masi. Prethodne studije pokazale su povećanje ekspresije CS-4 i CS-6 nakon povrede u CNS-u adulta (McKeon i sar., 1991; Asher i sar., 2002; Properzi i sar., 2003, 2005; Gilbert i sar., 2005; Dacic i sar., 2008). I mi smo pokazali da ablacija senzomotorne kore povećava ekspresiju i CS-4 i CS-6. Imunoreakcija je najintenzivnija oko lezije, ali su njihovi obrasci ekspresije u oba posmatrana dana drugačiji. Kod CS-4 imunoreakcija je prisutna

u zrnastoj formi na površini ćelija u 7. danu da bi se u 14. danu imunobojenje intenzivnije uočavalo u ECM-u. Kod CS-6 intenzivnija reakcija detektuje se na površini tela neurona u oba posmatrana dana. Pokazano je da postoji razlika u ekspresiji ovih CS-GAG nakon ASK kod mladih i adultnih životinja, i da je ne samo količina već i obrazac ekspresije CSPG bitan faktor koji utiče na smanjeni oporavak kod adulta nakon povrede CNS (Dacic i sar., 2008).

Bolje razumevanje relativne distribucije CS-GAG, kao i njihovog doprinosa inhibitornom efektu glijskog ožiljka, neophodno je za razvoj specifičnih strategija za prevazilaženje neuspešne regeneracije nakon povrede CNS-a.

Kao što je prethodno diskutovano, tretman B vitaminima i ribavirinom smanjuje reaktivnu astrogliozu i glijski ožiljak koji predstavljaju barijeru za regeneraciju aksona. Međutim, poznato je da se i u odsustvu vidljivog glijskog ožiljka ne postiže izrastanje aksona u CNS-u što ukazuje da reaktivni astrociti na mestu povrede uspostavljaju lokalnu biohemijsku barijeru koja sprečava regeneraciju aksona (Davies i sar., 1996). Danas je dobro poznato da proteoglikani povezani sa reaktivnim astrocitima inhibiraju izrastanje neurita *in vitro* (Snow i sar., 1996; McKeon i sar., 1991; Dou i Levine, 1994; Canning i sar., 1996; Tom i sar., 2004). Takođe, pokazano je da imaju ključnu ulogu u formiranju nepermisivne sredine i sprečavaju uspešnu regeneraciju adultnih neurona nakon povrede *in vivo* (Fawcett i Asher, 1999; Morgenstern i sar., 2002; Properzi i Fawcett, 2004; Sandvig i sar., 2004; Silver i Miller, 2004). Modifikacije ovih molekula omogućavaju uspešnu regeneraciju aksona (Moon i sar., 2001; Bradbury i sar., 2002; Silver i Miller, 2004; Houle i sar., 2006; Cafferty i sar., 2007). Najzastupljeniji CSPG u adultnom CNS-u su iz lektikanske familije. Široko su rasprostranjeni u razviću, učestvuju u pokretljivosti ćelija, izrastanju neurita i sinaptičkoj plastičnosti (Hartmann i Maurer, 2001), ali i ograničavaju plastičnost u adultnom CNS, što je potvrđeno u eksperimentima u kojima se određenim enzimima uklanjaju GAG lanci (Moon i sar., 2001; Bradbury i sar., 2002; Dityatev i Schachner, 2003; Harris i sar., 2013).

Lektikani se razlikuju po vremenskoj i prostornoj distribuciji. Tako je u ranom razviću detektovana maksimalna ekspresija versikana i neurokana koja se značajno smanjuje ubrzo posle rođenja, dok su brevikan i agrekan slabo ekspimirani u ranoj ontogenezi, a veoma zastupljeni u adultnom CNS-u (Milev i sar., 1998; Schmalfeldt i sar., 1998; Rauch i sar., 2001; Matthews i sar., 2002; Viapiano i sar., 2003). Pokazano je da je ožiljno tkivo oko mesta povrede bogato lektikanima (Silver i Miller, 2004; Harris i sar., 2009). Ove različite vremenske ekspresije lektikana, ali i ostalih CSPG, ukazuju na njihove različite uloge u razviću i u adultnom nervnom sistemu, ali i u intaktnom i povređenom CNS-u.

U ovoj tezi pratili smo ekspresiju fosfakana, neurokana i brevikana. Imunohistohemijsko obeležavanje pokazalo je njihovu različitu distribuciju kod neoperisanih životinja. Odnos između ovih CSPG unutar perineuronalne mreže varira u zavisnosti od regiona, kao i od sloja kore (Haunsø i sar., 1999).

Fosfakan sintetišu i oslobađaju astrociti (Milev i sar., 1994). Njegova lokalizacija, građa i stepen sulfatacije menjaju se sa razvićem nervnog sistema (Meyer-Puttlitz i sar., 1996). U toku embrionalnog razvića i u ranom postnatalnom mozgu pacova imunoreakcija na fosfakan prisutna je u neuropilu kore prednjeg mozga, dok je u mozgu adultnih pacova lokalizovana samo oko parvalbumin pozitivnih gabaergičkih neurona (Haunsø i sar., 1999). Fosfakan nastaje alternativnom obradom transkripta za RPTP β kao jedan od tri izoforme. Dve su membranske izoforme (RPTP β i short RPTP β) i jedna je sekretovana (fosfakan). Receptorske izoforme su najzastupljenije u glijskim progenitorskim ćelijama u proliferativnim zonama i to u toku ranog razvića mozga, dok se ekspresija fosfakana naglo povećava kasnije u perinatalnom razviću i ostaje na tom nivou i kod adulta (Maurel i sar., 1994; Canoll i sar., 1996; Sakurai i sar., 1996; Margolis i sar., 1996).

Pokazano je da fosfakan može podstaći ili inhibirati rast aksona, npr. potpomaže izrastanje neurona hipokampusa delujući preko CS lanaca dok preko proteinskog jezgra inhibira izrastanje ganglijskih ćelija retine (Faissner i sar., 1994; Garwood i sar., 1999; Inatani i sar., 2001). Poznato je da se nivo

fosfakana značajno smanjuje u toku prve nedelje nakon lezije kore prednjeg mozga (McKeon i sar., 1999; Dobbertin i sar., 2003), u modelu epilepsije izazvane kainičnom kiselinom i kod Ihara epileptičnih pacova, koji su animalni model epilepsije slepoočnog režnja (Wu i sar., 2000; Kurazono i sar., 2001), kao i nakon povreda kičmene moždine (Jones i sar., 2003b). Nasuprot tome, većina CSPG-a, uključujući neurokan, brevikan, versikan, NG2, dekorin i biglikan, rapidno se povećava nakon povrede CNS-a (Levine, 1994; Haas i sar., 1999; Jaworski i sar., 1999; McKeon i sar., 1999; Asher i sar., 2000; 2002, Thon i sar., 2000; Moon i sar., 2002; Jones i sar., 2003b; Aya-ay i sar., 2005). Dobbertin i saradnici (2003) su pokazali da je nivo iRNK za fosfakan značajno smanjen 2. i 4. dana nakon povrede kore prednjeg mozga, a da se u 7. i 14. danu nakon povrede vraća na kontrolni nivo. Rezultati dobijeni u našem radu pokazuju da nema statistički značajne promene na nivou iRNK za fosfakan u 14. danu posle ablacije desne senzomotorne kore pacova u odnosu na kontrolne grupe. Pod uticajem tretmana koktelom svih pet B vitamina nivo iRNK za fosfakan značajno je smanjen kod LK grupe (za 36%, #p<0,05) u odnosu na kontrolnu vrednost. Uprkos ovakvom efektu B vitamina nema statistički značajne razlike u ekspresiji iRNK u odnosu na L grupu.

Izvor neurokana su neuroni, a nakon povrede pretežno reaktivni astrociti (Haas i sar., 1999; McKeon i sar., 1999; Asher i sar., 2000; Beggah i sar., 2005). U toku razvića uglavnom je prisutna izoforma sa punom dužinom (od 250 kDa), a u adultnom mozgu detektuju se dva sečena kraća produkta (od 150 i 130 kDa) (Matsui i sar., 1994; Rauch i sar., 2001). Povreda CNS-a povećava ekspresiju neurokana i to njegove izoforme sa punom dužinom (Matsui i sar., 2002; Deguchi i sar., 2005). Ekspresija kraćih izoformi je sporija i maksimum dostiže oko druge nedelje posle povrede (Jones i sar., 2003, a, b; Tang i sar., 2003). Pretpostavlja se da kasnije isecanje juvenilne forme neurokana omogućava njegovo nakupljanje u periodu intenzivnog remodelovanja ECM-a (Rauch i sar., 2004). Zamena ove forme kraćim adultnim izoformama

ograničava pokretljivost nervnih ćelija kao i njihovih nastavaka (Rauch i sar., 2001, 2004).

U istraživanjima prikazanim u ovoj tezi nismo detektovali promene na nivou iRNK za neurokan u 14. danu posle ASK kod kontrolnih intaktnih životinja i onih koje su tretirane B vitaminima i ribavirinom. To ukazuje da ispitivane supstance ne utiču na nivo ekspresije iRNK u odsustvu lezije. Kod SKR grupe u 14. danu nakon sham operacije detektovan je statistički značajno povišen nivo ekspresije iRNK (za 47%, #p<0,05). Slični rezultati su dokumentovani i kod drugih autora. Na primer, nakon CCI nivo ekspresije iRNK za neurokan u ipsilateralnoj kori sham životinja raste u 4. danu, pa opada, ali u 14. danu još uvek ostaje iznad kontrolnih vrednosti (nije statistički značajno)(Harris i sar., 2009). Sama ablacija značajno povećava nivo iRNK za 35% (#p<0,05). Primenjeni tretman B vitaminima povećava gensku ekspresiju u odnosu na kontrolni nivo, ali to povećanje u odnosu na L grupu nije bilo statistički značajno. Budući da antitelo korišćeno u ovoj tezi prepoznaje i juvenilnu izoformu neurokana kao i kraće adultne izoforme bez dodatne provere nemoguće je oceniti koja je od izoformi odgovorna za znatno povećanje iRNK za neurokan nakon tretmana B vitaminima.

Brevikan je specifičan samo za CNS i široko je zastupljen u adultnom mozgu (Yamaguchi, 1996; Yamada i sar., 1997; Seidenbecher i sar., 1998). Prvenstveno ga oslobađaju astrociti, a u manjoj meri oligodendrociti i neuroni. To je protein od 145 kD za koji su kovalentno vezana do tri hondroitin sulfatna lanca. Alternativno isecanje genskog transkripta, enzimsko sečenje i različita glikozilacija dovode do nastanka heterogenih izoformi brevikana (Yamaguchi, 2000; Yuan i sar., 2002; Jones i sar., 2003, a, b; Tang i sar., 2003; Mayer i sar., 2005; Aya-ay i sar., 2005). Izoforma 1 je sekretovana u ECM, dok je izoforma 2 vezana za membranu. Pokazano je da C terminalni domen brevikana može da stimuliše rast neurita *in vitro* najverovatnije vezivanjem za sulfatisane glikolipide bogato zastupljene u nervnom tkivu (Miura i sar., 2001). Brevikan je pojačano sintetisan u glijskom ožiljku nakon povrede CNS (Jaworski i sar., 1999;

Thon i sar., 2000; Beggah i sar., 2005). Nađen je u regionima gde su gusto pakovani nastavci astrociti i pokazano je da ovaj CSPG oslobađaju reaktivni, nestin negativni astrociti (Beggah i sar., 2005). Ni kod jedne ispitivane grupe nismo uočili promene na nivou iRNK za brevikan u 14. danu posle ASK.

Dakle, rezultati prikazani u ovoj tezi pokazali su povećan nivo iRNK za neurokan u kori u 14. danu nakon ASK, a u isto vreme ablacija nije imala efekta na ekspresiju iRNK za fosfakan i brevikan. Da povreda različito utiče na nivo ekspresije iRNK za fosfakan, neurokan i brevikan pokazano je i *in vitro* modelu u našem najnovijem radu (Parabucki i sar., 2013, u štampi). Za razliku od RT-PCR analize, IHC bojenje u 14. danu pokazuje povećanje ekspresije za sva tri ispitivana CSPG oko mesta lezije. Iz literature je poznato da imunohistohemijsko bojenja tkiva 7. dana nakon CCI pokazuje izrazito povećanje ekspresije CSPG proteina u regionima kore oko glijskog ožiljka što se zadržava i u 14. danu (Harris i sar., 2009), baš kao i u našem eksperimentu. Ono što je bilo iznenađujuće jesu naizgled kontradiktorni rezultati WB analize u odnosu na IHC zapaženo povećanje ekspresije CSPG. Naime, Harris i saradnici su utvrdili da se nivo proteina svih ispitivanih CSPG značajno smanjuje u prvoj nedelji posle ASK, da bi zatim krenuo da se normalizuje, ali je u 14. danu ekspresija ispitivanih CSPG još uvek ispod kontrolnih vrednosti (Harris i sar., 2009). Međutim, treba imati u vidu da se WB analiza odnosi na ukupni efekat povrede, dok rezultati IHC bojenja ukazuju na povećanje CSPG samo u glijskom ožiljku, dok su veliki regioni kore i dalje sa niskim intenzitetom reakcije.

Primena svih pet B vitamina nakon ASK smanjuje ekspresiju neurokana, fosfakana i brevikana i svodi je uglavnom na usku zonu oko mesta povrede. Ovi rezultati predstavljaju prve nalaze o dejstvu B vitamina na ekspresiju CSPG nakon povrede mozga.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu postavljenih ciljeva i analizom dobijenih rezultata, kao i njihovim poređenjem sa publikovanim rezultatima iz ove oblasti, definisani su sledeći zaključci:

1. Ablacija senzomotorne kore prednjeg mozga pacova smanjuje stepen koordinacije pokreta zadnje šape suprotne (kontralateralne) strane tela. Iako tokom oporavka dolazi do spontanog poboljšanja uočenog motoričkog deficita kod svih grupa životinja, ispitivani tretmani ispoljavaju dodatni pozitivan uticaj na brzinu i domet tog oporavka. Najveći uticaj na brzinu oporavka i na ocenu na kraju eksperimentalnog perioda (14.-tog dana nakon operacije) pokazuje primena kombinacije svih pet B vitamina, kao i kombinacija B vitamina i ribavirina. Nešto slabiji, ali značajan efekat pokazuju kombinacije dva B vitamina (B2, B3) i pojedinačna primena ribavirina. Tretman kombinacijom tri B vitamina (B1, B6, B12), u dozama koje su korišćene u tezi, nije ispoljio značajan uticaj na oporavak motorne koordinacije u ovom modelu povrede.
2. Primena B vitamina i ribavirina menja odgovor nervnih ćelija i povećava sinaptičku plastičnost nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga. Primenjeni tretmani specifično povećavaju ekspresiju markera izrastanja aksona, dendrita i formiranja sinapsi (GAP-43, MAP2 i sinaptofizina). Kompleks svih 5 B vitamina (LK), i, naročito, njegova kombinacija sa RBV (LKR), ispoljavaju najizraženiji efekat. Njihova primena podstiče izrastanje aksona i dendrita, grananje dendrita kao i formiranje novih sinapsi. To verovatno doprinosi stvaranju novih sinaptičkih veza, čime se može objasniti zapaženi brži oporavak motorike zadnjeg kontralateralnog ekstremiteta.

3. B vitamini (pre svega kombinacija B2 i B3), njihova kombinacija sa RBV (LKR), kao i sam RBV (LR), pokazuju izrazito povoljan efekat u očuvanju morfologije neurona, kao i u smanjenju broja degenerisanih neurona. Naime, primenjeni tretmani smanjuju uobičajenu sekundarnu progresiju neuronalnih oštećenja, i usporavaju procese neurodegeneracije i apoptoze.
4. Primena navedenih kombinacija B vitamina i ribavirina različito moduliše odgovor astrocita nakon ablacije senzomotorne kore kako na genskom, tako i na proteinskom nivou. Koktel svih pet B vitamina ima najizraženije dejstvo i najviše smanjuje povredom indukovano povećanje ekspresije GFAP i vimentina koji se smatraju specifičnim markerima reaktivnih astrocita. Sa druge strane, imunohistohemijska analiza ukazuje da sve primenjene kombinacije izazivaju izrazite morfološke promene astrocita, koji zadobijaju odlike slične neaktiviranim, mirujućim astrocitima sa sitnim ćelijskim telom i tankim i dugačkim nastavcima.
5. Primenjeni tretmani dovode do značajnog smanjenja ekspresije S100B nakon povrede i to sa sledećom efikasnošću LKR >> LR > LK.
6. Tretman kombinacijom svih pet B vitamina smanjuje prisustvo NG2 pozitivnih ćelija oko mesta povrede, kao i ekspresiju NG2 proteoglikana.
7. Ablacija senzomotorne kore povećava ekspresiju CS-4 i CS-6 proteoglikana, najviše oko same lezije, a imunoreakcija se detektuje na površini ćelija, kako neurona tako i astrocita.
8. Kombinacija svih pet B vitamina ne utiče značajno na ekspresiju iRNK za neurokan, fosfakan i brevikan u 14. danu nakon ablacije

senzomotorne kore. Međutim, imunohistohemijska analiza pokazuje da primenjeni tretman značajno smanjuje povredom indukovano povećanje ekspresije ovih proteoglikana oko mesta povrede.

•••

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske teze pokazuju da primena kompleksa vitamina B, bilo pojedinačno ili u kombinaciji sa nukleozidnim analogom ribavirinom, poboljšava oporavak motorne koordinacije nakon ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova. Na ćelijskom i molekulskom nivou, primenjene kombinacije vitamina i ribavirina ublažavaju proces reaktivne glioze, smanjuju proliferaciju reaktivnih astrocita i NG2 ćelija oko mesta lezije, broj degenerisanih neurona i ekspresiju komponenti vanćelijskog matriksa. Svi navedeni efekti redukuju stvaranje glijskog ožiljka i povećavaju permisivnost moždanog tkiva oko mesta povrede, formirajući sredinu koja više pogoduje izrastanju aksona i remodeliranju postojećih i formiranju novih sinapsi. Za razvoj specifičnih strategija za prevazilaženje neuspešne regeneracije nakon povrede CNS-a neophodno je bolje razumevanje kako distribucija CS-GAG, kao i stepen njihove sulfatacije, doprinose inhibitornom efektu glijskog ožiljka. Rezultati prikazani u ovoj tezi ukazuju na to da bi koktel B (B1, B2, B3, B6 i B12) vitamina u kombinaciji sa ribavirinom mogao da bude efektivan tretman u terapiji povrede mozga, što zahteva dalju kliničku proveru.

7. LITERATURA

- Aarts LH, Verkade P, van Dalen JJ, van Rozen AJ, Gispen WH, Schrama LH, Schotman P. B-50/GAP-43 potentiates cytoskeletal reorganization in raft domains. *Mol Cell Neurosci*. 1999;14(2):85-97.
- Abdel-Salam OM. Antinociceptive and behavioral effects of ribavirin in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006;83(2):230-8.
- Aigner L, Caroni P. Absence of persistent spreading, branching, and adhesion in GAP-43-depleted growth cones. *J Cell Biol*. 1995;128(4):647-60.
- Aikawa H, Watanabe IS, Furuse T, Iwasaki Y, Satoyoshi E, Sumi T, Moroji T. Low energy levels in thiamine-deficient encephalopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1984;43(3):276-87.
- Akaike A, Tamura Y, Sato Y, Yokota T. Protective effects of a vitamin B12 analog, ethylcobalamin, against glutamate cytotoxicity in cultured cortical neurons. *Eur J Pharmacol*. 1993;241(1):1-6.
- Akulinin VA, Dahlstrom A. Quantitative analysis of MAP2 immunoreactivity in human neocortex of three patients surviving after brain ischemia. *Neurochem Res*. 2003;28(2):373-8.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*. 1999;22(5):208-15.
- Araya R, Kudo M, Kawano M, Ishii K, Hashikawa T, Iwasato T, Itohara S, Terasaki T, Oohira A, Mishina Y, Yamada M. BMP signaling through BMPRIA in astrocytes is essential for proper cerebral angiogenesis and formation of the blood-brain-barrier. *Mol Cell Neurosci*. 2008;38(3):417-30.
- Ard MD, Schachner M, Rapp JT, Faissner A. Growth and degeneration of axons on astrocyte surfaces: effects on extracellular matrix and on later axonal growth. *Glia*. 1993;9(4):248-59.
- Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braistead JE, Levine JM, Margolis RU, Rogers JH, Fawcett JW. Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci*. 2000;20(7):2427-38.
- Asher RA, Morgenstern DA, Moon LD, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans: inhibitory components of the glial scar. *Prog Brain Res*. 2001;132:611-9.
- Asher RA, Morgenstern DA, Shearer MC, Adcock KH, Pesheva P, Fawcett JW. Versican is upregulated in CNS injury and is a product of oligodendrocyte lineage cells. *J Neurosci*. 2002;22(6):2225-36.
- Assouline JG, Pantazis NJ. Detection of a nerve growth factor receptor on fetal human Schwann cells in culture: absence of the receptor on fetal human astrocytes. *Brain Res Dev Brain Res*. 1989;45(1):1-14.
- Aya-ay J, Mayer J, Eakin AK, Muffly BG, Anello M, Sandy JD, Gottschall PE. The effect of hypoxic-ischemic brain injury in perinatal rats on the abundance and proteolysis of brevican and NG2. *Exp Neurol*. 2005;193(1):149-62.
- Ayoub IA, Lee EJ, Ogilvy CS, Beal MF, Maynard KI. Nicotinamide reduces infarction up to two hours after the onset of permanent focal cerebral ischemia in Wistar rats. *Neurosci Lett*. 1999;259(1):21-4.
- Ayoub IA, Maynard KI. Therapeutic window for nicotinamide following transient focal cerebral ischemia. *Neuroreport*. 2002;13(2):213-6.
- Bâ A. Functional vulnerability of developing central nervous system to maternal thiamine deficiencies in the rat. *Dev Psychobiol*. 2005;47(4):408-14.
- Bâ A. Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. *Cell Mol Neurobiol*. 2008;28(7):923-31.
- Bandtlow C, Zachleder T, Schwab ME. Oligodendrocytes arrest neurite growth by contact inhibition. *J Neurosci*. 1990;10(12):3837-48.

- Bandtlow CE, Zimmermann DR. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev.* 2000;80(4):1267-90.
- Barbre AB, Hoane MR. Magnesium and riboflavin combination therapy following cortical contusion injury in the rat. *Brain Res Bull.* 2006;69(6):639-46.
- Barnabé-Heider F, Göritz C, Sabelström H, Takebayashi H, Pfrieger FW, Meletis K, Frisé J. Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell.* 2010;7(4):470-82.
- Barritt AW, Davies M, Marchand F, Hartley R, Grist J, Yip P, McMahon SB, Bradbury EJ. Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2006;26(42):10856-67.
- Bartus K, James ND, Bosch KD, Bradbury EJ. Chondroitin sulphate proteoglycans: key modulators of spinal cord and brain plasticity. *Exp Neurol.* 2012;235(1):5-17.
- Baskin YK, Dietrich WD, Green EJ. Two effective behavioral tasks for evaluating sensorimotor dysfunction following traumatic brain injury in mice. *J Neurosci Methods.* 2003;129(1):87-93.
- Bass NH, Hess HH, Pope A, Thalheimer C. Quantitative cytoarchitectonic distribution of neurons, glia, and DNA in rat cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 1971;143(4):481-90.
- Beggah AT, Dours-Zimmermann MT, Barras FM, Brosius A, Zimmermann DR, Zurn AD. Lesion-induced differential expression and cell association of Neurocan, Brevican, Versican V1 and V2 in the mouse dorsal root entry zone. *Neurosci.* 2005;133(3):749-62.
- Belenky P, Bogan KL, Brenner C. NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends Biochem Sci.* 2007;32(1):12-9.
- Bender DA. Non-nutritional uses of vitamin B6. *Br J Nutr.* 1999;81(1):7-20.
- Benfey M, Aguayo AJ. Extensive elongation of axons from rat brain into peripheral nerve grafts. *Nature.* 1982;296(5853):150-2.
- Benowitz LI, Perrone-Bizzozero NI, Finklestein SP, Bird ED. Localization of the growth-associated phosphoprotein GAP-43 (B-50, F1) in the human cerebral cortex. *J Neurosci.* 1989;9(3):990-5.
- Benowitz LI, Perrone-Bizzozero NI. The expression of GAP-43 in relation to neuronal growth and plasticity: when, where, how, and why? *Prog Brain Res.* 1991;89:69-87.
- Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci.* 1997;20(2):84-91.
- Benson MD, Romero MI, Lush ME, Lu QR, Henkemeyer M, Parada LF. Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(30):10694-9.
- Betz AL, Ren XD, Ennis SR, Hultquist DE. Riboflavin reduces edema in focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 1994;60:314-7.
- Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.* 1972;43(2):429-35.
- Bignami A. Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Müller glia. Immunofluorescence study of the goldfish retina. *Brain Res.* 1984;300(1):175-8.
- Bjelobaba I, Lavrnja I, Parabucki A, Stojkov D, Stojiljkovic M, Pekovic S, Nedeljkovic N. The cortical stab injury induces beading of fibers expressing ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3. *Neuroscience.* 2010;170(1):107-16.
- Bocquet A, Berges R, Frank R, Robert P, Peterson AC, Eyer J. Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization. *J Neurosci.* 2009;29(35):11043-54.
- Bomze HM, Bulsara KR, Iskandar BJ, Caroni P, Skene JH. Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons. *Nat Neurosci.* 2001;4(1):38-43.

- Boros LG, Steinkamp MP, Fleming JC, Lee WN, Cascante M, Neufeld EJ. Defective RNA ribose synthesis in fibroblasts from patients with thiamine-responsive megaloblastic anemia (TRMA). *Blood*. 2003;102(10):3556-61.
- Bovolenta P, Fernaud-Espinosa I. Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. *Prog Neurobiol*. 2000;61(2):113-32.
- Bradbury EJ, Carter LM. Manipulating the glial scar: chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. *Brain Res Bull*. 2011;84(4-5):306-16.
- Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*. 2002;416(6881):636-40.
- Bray GM, Rasminsky M, Aguayo AJ. Interactions between axons and their sheath cells. *Annu Rev Neurosci*. 1981;4:127-62.
- Brettschneider J, Petzold A, Süssmuth SD, Ludolph AC, Tumani H. Axonal damage markers in cerebrospinal fluid are increased in ALS. *Neurology*. 2006;66(6):852-6.
- Brkic P, Stojiljkovic M, Jovanovic T, Dacic S, Lavrnja I, Savic D, Parabucki A, Bjelobaba I, Rakic L, Pekovic S. Hyperbaric oxygenation improves locomotor ability by enhancing neuroplastic responses after cortical ablation in rats. *Brain Inj*. 2012;26(10):1273-84
- Brock TO, O'Callaghan JP. Quantitative changes in the synaptic vesicle proteins synapsin I and p38 and the astrocyte-specific protein glial fibrillary acidic protein are associated with chemical-induced injury to the rat central nervous system. *J Neurosci*. 1987;7(4):931-42.
- Brozzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: Implications for astrocytes development, activation and tumor growth. *J Biol Chem*. 2009;284(13):8797-811.
- Bubber P, Ke ZJ, Gibson GE. Tricarboxylic acid cycle enzymes following thiamine deficiency. *Neurochem Int*. 2004;45(7):1021-8.
- Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, Mori T, Götz M. Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(9):3581-6.
- Buffo A, Rolando C, Ceruti S. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol*. 2010;79(2):77-89.
- Büki A, Kövesdi E, Pál J, Czeiter E. Clinical and model research of neurotrauma. *Methods Mol Biol*. 2009;566:41-55.
- Büki A, Povlishock JT. All roads lead to disconnection?--Traumatic axonal injury revisited. *Acta Neurochir (Wien)*. 2006;148(2):181-93.
- Burbach GJ, Dehn D, Del Turco D, Staufenbiel M, Deller T. Laser microdissection reveals regional and cellular differences in GFAP mRNA upregulation following brain injury, axonal denervation, and amyloid plaque deposition. *Glia*. 2004;48(1):76-84.
- Busch SA, Silver J. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr Opin Neurobiol*. 2007;17(1):120-7.
- Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostensfeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*. 1999;23(2):297-308.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci*. 2002;22(1):183-92.
- Butt AM, Pugh M, Hubbard P, James G. Functions of optic nerve glia: axoglial signalling in physiology and pathology. *Eye (Lond)*. 2004;18(11):1110-21.

- Butterworth RF, Kril JJ, Harper CG. Thiamine-dependent enzyme changes in the brains of alcoholics: relationship to the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol Clin Exp Res.* 1993; 17(5):1084-8.
- Cabrini L, Bergami R, Fiorentini D, Marchetti M, Landi L, Tolomelli B. Vitamin B6 deficiency affects antioxidant defences in rat liver and heart. *Biochem Mol Biol Int.* 1998;46(4):689-97.
- Caceres A, Mautino J, Kosik KS. Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron.* 1992;9(4):607-18.
- Cafferty WB, Yang SH, Duffy PJ, Li S, Strittmatter SM. Functional axonal regeneration through astrocytic scar genetically modified to digest chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurosci.* 2007;27(9):2176-85.
- Calingasan NY, Chun WJ, Park LC, Uchida K, Gibson GE. Oxidative stress is associated with region-specific neuronal death during thiamine deficiency. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999;58(9):946-58.
- Callahan LM, Vaules WA, Coleman PD. Progressive reduction of synaptophysin message in single neurons in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002;61(5):384-95.
- Calvo JL, Carbonell AL, Boya J. Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats. *Brain Res.* 1991;566(1-2):333-6.
- Canning DR, Höke A, Malemud CJ, Silver J. A potent inhibitor of neurite outgrowth that predominates in the extracellular matrix of reactive astrocytes. *Int J Dev Neurosci.* 1996;14(3):153-75.
- Canoll PD, Petanceska S, Schlessinger J, Musacchio JM. Three forms of RPTP-beta are differentially expressed during gliogenesis in the developing rat brain and during glial cell differentiation in culture. *J Neurosci Res.* 1996;44(3):199-215.
- Carden MJ, Trojanowski JQ, Schlaepfer WW, Lee VM. Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *J Neurosci.* 1987;7(11):3489-504.
- Carmichael ST, Archibeque I, Luke L, Nolan T, Momiy J, Li S. Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex. *Exp Neurol.* 2005;193(2):291-311.
- Carr SF, Papp E, Wu JC, Natsumeda Y. Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *J Biol Chem.* 1993;268(36):27286-90.
- Castellanos NP, Paúl N, Ordóñez VE, Demuynck O, Bajo R, Campo P, Bilbao A, Ortiz T, del-Pozo F, Maestú F. Reorganization of functional connectivity as a correlate of cognitive recovery in acquired brain injury. *Brain.* 2010;133(Pt 8):2365-81.
- Celio MR, Spreafico R, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L. Perineuronal nets: past and present. *Trends Neurosci.* 1998;21(12):510-5.
- Cervós-Navarro J, Lafuente JV. Traumatic brain injuries: structural changes. *J Neurol Sci.* 1991;103 Suppl:S3-14.
- Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature.* 2000;403(6768):434-9.
- Chen ZJ, Negra M, Levine A, Ughrin Y, Levine JM. Oligodendrocyte precursor cells: reactive cells that inhibit axon growth and regeneration. *J Neurocytol.* 2002;31(6-7):481-95.
- Chong ZZ, Maiese K. Enhanced tolerance against early and late apoptotic oxidative stress in mammalian neurons through nicotinamidase and sirtuin mediated pathways. *Curr Neurovasc Res.* 2008;5(3):159-70.

- Chou AK, Muhammad R, Huang SM, Chen JT, Wu CL, Lin CR, Lee TH, Lin SH, Lu CY, Yang LC. Altered synaptophysin expression in the rat spinal cord after chronic constriction injury of sciatic nerve. *Neurosci Lett*. 2002;333(3):155-8.
- Christman CW, Salvant JB Jr, Walker SA, Povlishock JT. Characterization of a prolonged regenerative attempt by diffusely injured axons following traumatic brain injury in adult cat: a light and electron microscopic immunocytochemical study. *Acta Neuropathol*. 1997;94(4):329-37.
- Chu D, Huttenlocher PR, Levin DN, Towle VL. Reorganization of the hand somatosensory cortex following perinatal unilateral brain injury. *Neuropediatrics*. 2000;31(2):63-9.
- Clifton GL, Jiang JY, Lyeth BG, Jenkins LW, Hamm RJ, Hayes RL. Marked protection by moderate hypothermia after experimental traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1991;11(1):114-21.
- Coggins PJ, Zwiers H. B-50 (GAP-43): biochemistry and functional neurochemistry of a neuron-specific phosphoprotein. *J Neurochem*. 1991;56(4):1095-106.
- Cohen RS, Pant HC, House S, Gainer H. Biochemical and immunocytochemical characterization and distribution of phosphorylated and nonphosphorylated subunits of neurofilaments in squid giant axon and stellate ganglion. *J Neurosci*. 1987;7(7):2056-74.
- Coles CH, Shen Y, Tenney AP, Siebold C, Sutton GC, Lu W, Gallagher JT, Jones EY, Flanagan JG, Aricescu AR. Proteoglycan-specific molecular switch for RPTP σ clustering and neuronal extension. *Science*. 2011;332(6028):484-8.
- Collard JF, Côté F, Julien JP. Defective axonal transport in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1995;375(6526):61-4.
- Cooper GM, Hausman RE. 2003. *The Cell: A Molecular Approach* 3d ed. Amer. Soc. Microbiol., Washington and Sinauer Assoc., Sunderland, MA.
- Correia I, Chu D, Chou YH, Goldman RD, Matsudaira P. Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages. *J Cell Biol*. 1999;146(4):831-42.
- Cotman CV, Gomez-Pinilla F, Kahle JS. Neural plasticity and regeneration. *Basic Neuroch.*, Raven Press, New York, 1994; 607-26.
- Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z, Andino R, Cameron CE. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med*. 2000;6(12):1375-9.
- Cuskelly GJ, Stacpoole PW, Williamson J, Baumgartner TG, Gregory JF 3rd. Deficiencies of folate and vitamin B(6) exert distinct effects on homocysteine, serine, and methionine kinetics. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;281(6):E1182-90.
- da Cunha A, Vitković L. Regulation of immunoreactive GAP-43 expression in rat cortical macroglia is cell type specific. *J Cell Biol*. 1990;111(1):209-15.
- Dacic S, Pekovic S, Stojiljkovic M, Lavrnja I, Stojkov D, Bjelobaba I, Stojiljkovic BM. Pattern of Chondroitin Sulfate Proteoglycan Expression After Ablation Of The Sensorimotor Cortex Of The Neonatal And Adult Rat Brain. *Arch Biol Sci*. 2008; 60: 581-91.
- D'Ambrosio R, Maris DO, Grady MS, Winn HR, Janigro D. Selective loss of hippocampal long-term potentiation, but not depression, following fluid percussion injury. *Brain Res*. 1998;786(1-2):64-79.
- Damjanac M, Rioux Bilan A, Barrier L, Pontcharraud R, Anne C, Hugon J, Page G. Fluoro-Jade B staining as useful tool to identify activated microglia and astrocytes in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res*. 2007;1128(1):40-9.
- Dani JW, Armstrong DM, Benowitz LI. Mapping the development of the rat brain by GAP-43 immunocytochemistry. *Neuroscience*. 1991;40(1):277-87.

- Dash PK, Moore AN, Dixon CE. Spatial memory deficits, increased phosphorylation of the transcription factor CREB, and induction of the AP-1 complex following experimental brain injury. *J Neurosci*. 1995;15(3 Pt 1):2030-9.
- Dash PK, Zhao J, Hergenroeder G, Moore AN. Biomarkers for the diagnosis, prognosis, and evaluation of treatment efficacy for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2010;7(1):100-14.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*. 2005;8(6):752-8.
- Davies SJ, Field PM, Raisman G. Regeneration of cut adult axons fails even in the presence of continuous aligned glial pathways. *Exp Neurol*. 1996;142(2):203-16.
- De Camilli P, Miller PE, Navone F, Theurkauf WE, Vallee RB. Distribution of microtubule-associated protein 2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neuroscience*. 1984;11(4):817-46.
- de la Monte SM, Ng SC, Hsu DW. Aberrant GAP-43 gene expression in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 1995;147(4):934-46
- De Sarro A, Naccari F, De Sarro GB, Ammendola D, Rotiroti D, Trimarchi GR. Ribavirin-induced behavioral, body temperature and electrocortical spectra effects in the rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1990;304:125-35.
- de Vitry F, Picart R, Jacque C, Tixier-Vidal A. Glial fibrillary acidic protein. A cellular marker of tanycytes in the mouse hypothalamus. *Dev Neurosci*. 1981;4(6):457-60.
- de Waegh SM, Lee VM, Brady ST. Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell*. 1992;68(3):451-63.
- Deguchi K, Takaishi M, Hayashi T, Oohira A, Nagotani S, Li F, Jin G, Nagano I, Shoji M, Miyazaki M, Abe K, Huh NH. Expression of neurocan after transient middle cerebral artery occlusion in adult rat brain. *Brain Res*. 2005;1037(1-2):194-9.
- Dent EW, Meiri KF. Distribution of phosphorylated GAP-43 (neuromodulin) in growth cones directly reflects growth cone behavior. *J Neurobiol*. 1998;35(3):287-99.
- DiFiglia M, Roberts RC, Benowitz LI. Immunoreactive GAP-43 in the neuropil of adult rat neostriatum: localization in unmyelinated fibers, axon terminals, and dendritic spines. *J Comp Neurol*. 1990;302(4):992-1001.
- Dijk F, Bergen AA, Kamphuis W. GAP-43 expression is upregulated in retinal ganglion cells after ischemia/reperfusion-induced damage. *Exp Eye Res*. 2007;84(5):858-67.
- Dityatev A, Schachner M, Sonderegger P. The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(11):735-46.
- Dityatev A, Schachner M. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(6):456-68.
- Dixon CE, Lyeth BG, Povlishock JT, Findling RL, Hamm RJ, Marmarou A, Young HF, Hayes RL. A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurosurg*. 1987;67(1):110-9.
- Dobbertin A, Rhodes KE, Garwood J, Properzi F, Heck N, Rogers JH, Fawcett JW, Faissner A. Regulation of RPTPbeta/phosphacan expression and glycosaminoglycan epitopes in injured brain and cytokine-treated glia. *Mol Cell Neurosci*. 2003;24(4):951-71.
- Doerge KJ, Sasaki M, Kimura T, Yamada Y. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. *J Biol Chem*. 1991;266(2):894-902.
- Doster SK, Lozano AM, Aguayo AJ, Willard MB. Expression of the growth-associated protein GAP-43 in adult rat retinal ganglion cells following axon injury. *Neuron*. 1991;6(4):635-47.

- Dou CL, Levine JM. Inhibition of neurite growth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci*. 1994;14(12):7616-28.
- Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes—implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*. 1993;54(1):15-36.
- Emery DL, Raghupathi R, Saatman KE, Fischer I, Grady MS, McIntosh TK. Bilateral growth-related protein expression suggests a transient increase in regenerative potential following brain trauma. *J Comp Neurol*. 2000;424(3):521-31.
- Eng LF, Ghirnikar RS. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol*. 1994;4(3):229-37.
- Eyer J, Leterrier JF. Influence of the phosphorylation state of neurofilament proteins on the interactions between purified filaments in vitro. *Biochem J*. 1988;252(3):655-60.
- Faden AI. Experimental neurobiology of central nervous system trauma. *Crit Rev Neurobiol*. 1993;7(3-4):175-86.
- Faissner A, Clement A, Lochter A, Streit A, Mandl C, Schachner M. Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. *J Cell Biol*. 1994;126(3):783-99.
- Fattal-Valevski A. Thiamine (Vitamin B₁). *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 2011;16(1): 12-20.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2004;24(9):2143-55.
- Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*. 1999;49(6):377-91.
- Fawcett JW, Housden E, Smith-Thomas L, Meyer RL. The growth of axons in three-dimensional astrocyte cultures. *Dev Biol*. 1989a;135(2):449-58.
- Fawcett JW, Rokos J, Bakst I. Oligodendrocytes repel axons and cause axonal growth cone collapse. *J Cell Sci*. 1989b;92 (1):93-100.
- Fawcett JW. Recovery from spinal cord injury: regeneration, plasticity and rehabilitation. *Brain*. 2009;132(Pt 6):1417-8.
- Feeney DM, Gonzalez A, Law WA. Amphetamine, haloperidol, and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury. *Science*. 1982;217(4562):855-7.
- Feng Y, Paul IA, LeBlanc MH. Nicotinamide reduces hypoxic ischemic brain injury in the newborn rat. *Brain Res Bull*. 2006;69(2):117-22.
- Fidler PS, Schuette K, Asher RA, Dobbertin A, Thornton SR, Calle-Patino Y, Muir E, Levine JM, Geller HM, Rogers JH, Faissner A, Fawcett JW. Comparing astrocytic cell lines that are inhibitory or permissive for axon growth: the major axon-inhibitory proteoglycan is NG2. *J Neurosci*. 1999;19(20):8778-88.
- Fiskum G. Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural cell death. *J Neurotrauma*. 2000 Oct;17(10):843-55.
- Fitch MT, Doller C, Combs CK, Landreth GE, Silver J. Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. *J Neurosci*. 1999;19(19):8182-98.
- Fitch MT, Silver J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol*. 2008;209(2):294-301.
- Fitch MT, Silver J. Glial cell extracellular matrix: boundaries for axon growth in development and regeneration. *Cell Tissue Res*. 1997;290(2):379-84.
- Flaccus A, Janetzko A, Tekotte H, Margolis RK, Margolis RU. Immunocytochemical localization of chondroitin and chondroitin 4- and 6-sulfates in developing rat cerebellum. *J Neurochem*. 1991;56(5):1608-15.

- Folkerts MM, Berman RF, Muizelaar JP, Rafols JA. Disruption of MAP-2 immunostaining in rat hippocampus after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 1998;15(5):349-63.
- Franchetti P, Cappellacci L, Grifantini M. IMP dehydrogenase as a target of antitumor and antiviral chemotherapy. *Farmaco*. 1996;51(7):457-69.
- Franchetti P, Grifantini M. Nucleoside and non-nucleoside IMP dehydrogenase inhibitors as antitumor and antiviral agents. *Curr Med Chem*. 1999;6(7):599-614.
- Frank RA, Leeper FJ, Luisi BF. Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(7-8):892-905.
- Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci*. 1978;75(10):5034-8.
- Frederickson RC, Silver J. Glial cells. The unsung heroes of the brain. One company's view. *Biotechnology (N Y)*. 1991 ;9(11):1042-9.
- Frischknecht R, Heine M, Perrais D, Seidenbecher CI, Choquet D, Gundelfinger ED. Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci*. 2009;12(7):897-904.
- Friso S, Girelli D, Martinelli N, Olivieri O, Lotto V, Bozzini C, Pizzolo F, Faccini G, Beltrame F, Corrocher R. Low plasma vitamin B-6 concentrations and modulation of coronary artery disease risk. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(6):992-8.
- Frost SB, Barbay S, Friel KM, Plautz EJ, Nudo RJ. Reorganization of remote cortical regions after ischemic brain injury: a potential substrate for stroke recovery. *J Neurophysiol*. 2003;89(6):3205-14.
- Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol*. 1997;14(1-2):67-116.
- Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:345-82.
- Fujii A, Matsumoto H, Yamamoto H. Effect of vitamin B complex on neurotransmission and neurite outgrowth. *Gen Pharmacol*. 1996;27(6):995-1000.
- Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, Conte V, Stocchetti N, McIntosh TK. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004;28(4):365-78.
- Furutani R, Kibayashi K. Morphological alteration and reduction of MAP2-immunoreactivity in pyramidal neurons of cerebral cortex in a rat model of focal cortical compression. *J Neurotrauma*. 2012;29(6):1266-76.
- Galtrey CM, Fawcett JW. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev*. 2007;54(1):1-18.
- Galvin JE, Nakamura M, McIntosh TK, Saatman KE, Sampathu D, Raghupathi R, Lee VM, Trojanowski JQ. Neurofilament-rich intraneuronal inclusions exacerbate neurodegenerative sequelae of brain trauma in NFH/LacZ transgenic mice. *Exp Neurol*. 2000;165(1):77-89.
- Garwood J, Heck N, Reichardt F, Faissner A. Phosphacan short isoform, a novel non-proteoglycan variant of phosphacan/receptor protein tyrosine phosphatase-beta, interacts with neuronal receptors and promotes neurite outgrowth. *J Biol Chem*. 2003;278(26):24164-73.
- Garwood J, Schnädelbach O, Clement A, Schütte K, Bach A, Faissner A. DSD-1-proteoglycan is the mouse homolog of phosphacan and displays opposing effects on neurite outgrowth dependent on neuronal lineage. *J Neurosci*. 1999;19(10):3888-99.
- Gennarelli GA, Graham DI. Neuropathology. In Silver JM, McAllister TW, Yudofsky SC. *Textbook Of Traumatic Brain Injury*. Washington, DC: American Psychiatric Association. 2005:27-34.

- Gentile AM, Green S, Nieburgs A, Schmelzer W, Stein DG. Disruption and recovery of locomotor and manipulatory behavior following cortical lesions in rats. *Behav Biol.* 1978;22(4):417-55.
- Gilbert RJ, McKeon RJ, Darr A, Calabro A, Hascall VC, Bellamkonda RV. CS-4,6 is differentially upregulated in glial scar and is a potent inhibitor of neurite extension. *Mol Cell Neurosci.* 2005;29(4):545-58.
- Gispén WH, Leunissen JL, Oestreicher AB, Verkleij AJ, Zwieters H. Presynaptic localization of B-50 phosphoprotein: the (ACTH)-sensitive protein kinase substrate involved in rat brain polyphosphoinositide metabolism. *Brain Res.* 1985;328(2):381-5.
- Gispén WH. Neuronal plasticity and function. *Clin Neuropharmacol.* 1993;16 Suppl 1:S5-11.
- Giulian D, Li J, Li X, George J, Rutecki PA. The impact of microglia-derived cytokines upon gliosis in the CNS. *Dev Neurosci.* 1994;16(3-4):128-36.
- Giulian D, Robertson C. Inhibition of mononuclear phagocytes reduces ischemic injury in the spinal cord. *Ann Neurol.* 1990;27(1):33-42.
- Goffus AM, Anderson GD, Hoane M. Sustained delivery of nicotinamide limits cortical injury and improves functional recovery following traumatic brain injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2010;3(2):145-52.
- Gold BG, Austin DR, Griffin JW. Regulation of aberrant neurofilament phosphorylation in neuronal perikarya. II. Correlation with continued axonal elongation following axotomy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1991;50(5):627-48.
- Goldstein LB. Model of recovery of locomotor ability after sensorimotor cortex injury in rats. *ILAR J.* 2003;44(2):125-9.
- Goldstein LB. Rehabilitation and Recovery After Stroke. *Curr Treat Options Neurol.* 2000;2(4):319-328.
- Goldstein LB, Davis JN. Beam-walking in rats: studies towards developing an animal model of functional recovery after brain injury. *J Neurosci Methods.* 1990;31(2):101-7
- Goldstein LB. Rapid reliable measurement of lesion parameters for studies of motor recovery after sensorimotor cortex injury in the rat. *J Neurosci Methods.* 1993;48(1-2):35-42.
- Goldstein ME, Sternberger NH, Sternberger LA. Phosphorylation protects neurofilaments against proteolysis. *J Neuroimmunol.* 1987;14(2):149-60.
- Gonçalves CA, Leite MC, Nardin P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem.* 2008;41(10-11):755-63.
- González-Billault C, Engelke M, Jiménez-Mateos EM, Wandosell F, Cáceres A, Avila J. Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. *J Neurosci Res.* 2002;67(6):713-9.
- Gotow T, Takeda M, Tanaka T, Hashimoto PH. Macromolecular structure of reassembled neurofilaments as revealed by the quick-freeze deep-etch mica method: difference between NF-M and NF-H subunits in their ability to form cross-bridges. *Eur J Cell Biol.* 1992;58(2):331-45.
- Gotow T, Tanaka J, Takeda M. The organization of neurofilaments accumulated in perikaryon following aluminum administration: relationship between structure and phosphorylation of neurofilaments. *Neuroscience.* 1995;64(2):553-69.
- GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 2000;403:439-44.
- Greenwood JA, Troncoso JC, Costello AC, Johnson GV. Phosphorylation modulates calpain-mediated proteolysis and calmodulin binding of the 200-kDa and 160-kDa neurofilament proteins. *J Neurochem.* 1993;61(1):191-9.

- Griffith DA, Jarvis SM. Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1286(3):153-81.
- Gris P, Tighe A, Levin D, Sharma R, Brown A. Transcriptional regulation of scar gene expression in primary astrocytes. *Glia*. 2007;55(11):1145-55.
- Haas CA, Rauch U, Thon N, Merten T, Deller T. Entorhinal cortex lesion in adult rats induces the expression of the neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan in reactive astrocytes. *J Neurosci*. 1999;19(22):9953-63.
- Haas RH. Thiamin and the brain. *Annu Rev Nutr*. 1988;8:483-515.
- Hakim AM. The induction and reversibility of cerebral acidosis in thiamine deficiency. *Ann Neurol*. 1984;16(6):673-9.
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med*. 2007b;13(2):54-63.
- Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci*. 2007a;27(24):6473-7.
- Hall KD, Lifshitz J. Diffuse traumatic brain injury initially attenuates and later expands activation of the rat somatosensory whisker circuit concomitant with neuroplastic responses. *Brain Res*. 2010;1323:161-73.
- Hall RD, Lindholm EP. Organization of the motor and somatosensory neocortex in the albino rat. *Brain Res*. 1974;66: 23-38.
- Halpain S, Greengard P. Activation of NMDA receptors induces rapid dephosphorylation of the cytoskeletal protein MAP2. *Neuron*. 1990;5(3):237-46.
- Hamel MG, Mayer J, Gottschall PE. Altered production and proteolytic processing of brevican by transforming growth factor beta in cultured astrocytes. *J Neurochem*. 2005;93(6):1533-41.
- Hamilton N, Vayro S, Kirchoff F, Verkhratsky A, Robbins J, Gorecki DC, Butt AM. Mechanisms of ATP- and glutamate-mediated calcium signaling in white matter astrocytes. *Glia*. 2008;56(7):734-49.
- Hampton DW, Rhodes KE, Zhao C, Franklin RJ, Fawcett JW. The responses of oligodendrocyte precursor cells, astrocytes and microglia to a cortical stab injury, in the brain. *Neuroscience*. 2004;127(4):813-20.
- Harris NG, Carmichael ST, Hovda DA, Sutton RL. Traumatic brain injury results in disparate regions of chondroitin sulfate proteoglycan expression that are temporally limited. *J Neurosci Res*. 2009;87(13):2937-50.
- Harris NG, Nogueira MS, Verley DR, Sutton RL. Chondroitinase enhances cortical map plasticity and increases functionally active sprouting axons after brain injury. *J Neurotrauma*. 2013;30(14): 1257-69.
- Hartmann U, Maurer P. Proteoglycans in the nervous system--the quest for functional roles in vivo. *Matrix Biol*. 2001;20(1):23-35.
- Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006;70(3):789-829.
- Hatten ME, Liem RK, Shelanski ML, Mason CA. Astroglia in CNS injury. *Glia*. 1991;4(2):233-43.
- Hatten ME, Liem RK. Astroglial cells provide a template for the positioning of developing cerebellar neurons in vitro. *J Cell Biol*. 1981;90(3):622-30.
- Haunsø A, Celio MR, Margolis RK, Menoud PA. Phosphacan immunoreactivity is associated with perineuronal nets around parvalbumin-expressing neurones. *Brain Res*. 1999;834(1-2):219-22.

- Hazell AS, Butterworth RF, Hakim AM. Cerebral vulnerability is associated with selective increase in extracellular glutamate concentration in experimental thiamine deficiency. *J Neurochem.* 1993;61(3):1155-8.
- Heinrich CP, Stadler H, Weiser H. The effect of thiamine deficiency on the acetylcoenzyme A and acetylcholine levels in the rat brain. *J Neurochem.* 1973;21(5):1273-81.
- Herrmann JE, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen TK, Korsak RA, Takeda K, Akira S, Sofroniew MV. STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2008;28(28):7231-43.
- Hewett JA. Determinants of regional and local diversity within the astroglial lineage of the normal central nervous system. *J Neurochem.* 2009;110(6):1717-36.
- Hicks RR, Baldwin SA, Scheff SW. Serum extravasation and cytoskeletal alterations following traumatic brain injury in rats. Comparison of lateral fluid percussion and cortical impact models. *Mol Chem Neuropathol.* 1997;32(1-3):1-16.
- Hicks RR, Smith DH, McIntosh TK. Temporal response and effects of excitatory amino acid antagonism on microtubule-associated protein 2 immunoreactivity following experimental brain injury in rats. *Brain Res.* 1995;678(1-2):151-60.
- Hill SJ, Barbarese E, McIntosh TK. Regional heterogeneity in the response of astrocytes following traumatic brain injury in the adult rat. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996;55(12):1221-9.
- Hisanaga S, Hirokawa N. Dephosphorylation-induced interactions of neurofilaments with microtubules. *J Biol Chem.* 1990;265(35):21852-8.
- Hoane MR, Akstulewicz SL, Toppen J. Treatment with vitamin B3 improves functional recovery and reduces GFAP expression following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 2003;20(11):1189-99.
- Hoane MR, Gilbert DR, Holland MA, Pierce JL. Nicotinamide reduces acute cortical neuronal death and edema in the traumatically injured brain. *Neurosci Lett.* 2006a;408(1):35-9.
- Hoane MR, Kaplan SA, Ellis AL. The effects of nicotinamide on apoptosis and blood-brain barrier breakdown following traumatic brain injury. *Brain Res.* 2006b;1125(1):185-93.
- Hoane MR, Pierce JL, Kaufman NA, Beare JE. Variation in chronic nicotinamide treatment after traumatic brain injury can alter components of functional recovery independent of histological damage. *Oxid Med Cell Longev.* 2008;1(1):46-53.
- Hoane MR, Raad C, Barth TM. Non-competitive NMDA antagonists and anti-oxidant drugs reduce striatal atrophy and facilitate recovery of function following lesions of the rat cortex. *Restor Neurol Neurosci.* 1997;11(1):71-82.
- Hoane MR, Wolyniak JG, Akstulewicz SL. Administration of riboflavin improves behavioral outcome and reduces edema formation and glial fibrillary acidic protein expression after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2005;22(10):1112-22.
- Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol.* 1998;17(1):1-19.
- Hoffman PN, Griffin JW, Price DL. Control of axonal caliber by neurofilament transport. *J Cell Biol.* 1984;99(2):705-14.
- Holland MA, Tan AA, Smith DC, Hoane MR. Nicotinamide treatment provides acute neuroprotection and GFAP regulation following fluid percussion injury. *J Neurotrauma.* 2008;25(2):140-52.
- Holtmaat AJ, Dijkhuizen PA, Oestreicher AB, Romijn HJ, Van der Lugt NM, Berns A, Margolis FL, Gispen WH, Verhaagen J. Directed expression of the growth-associated protein B-50/GAP-43 to olfactory neurons in transgenic mice results in changes in axon morphology and extraglomerular fiber growth. *J Neurosci.* 1995;15(12):7953-65.

- Hoskison MM, Moore AN, Hu B, Orsi S, Kobori N, Dash PK. Persistent working memory dysfunction following traumatic brain injury: evidence for a time-dependent mechanism. *Neuroscience*. 2009;159(2):483-91.
- Hoskison MM, Shuttleworth CW. Microtubule disruption, not calpain-dependent loss of MAP2, contributes to enduring NMDA-induced dendritic dysfunction in acute hippocampal slices. *Exp Neurol*. 2006;202(2):302-12.
- Houle JD, Tom VJ, Mayes D, Wagoner G, Phillips N, Silver J. Combining an autologous peripheral nervous system "bridge" and matrix modification by chondroitinase allows robust, functional regeneration beyond a hemisection lesion of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*. 2006;26(28):7405-15.
- Hu H, Endres CJ, Chang C, Umapathy NS, Lee EW, Fei YJ, Itagaki S, Swaan PW, Ganapathy V, Unadkat JD. Electrophysiological characterization and modeling of the structure activity relationship of the human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3). *Mol Pharmacol*. 2006;69(5):1542-53.
- Huang GW, Liu H, Wang YM, Ren DL. Effects of folic acid, vitamin B(6) and vitamin B(12) on learning and memory function in cerebral ischemia rats. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2007;41(3):212-4.
- Huh JW, Laurer HL, Raghupathi R, Helfaer MA, Saatman KE. Rapid loss and partial recovery of neurofilament immunostaining following focal brain injury in mice. *Exp Neurol*. 2002;175(1):198-208.
- Huh JW, Raghupathi R, Laurer HL, Helfaer MA, Saatman KE. Transient loss of microtubule-associated protein 2 immunoreactivity after moderate brain injury in mice. *J Neurotrauma*. 2003;20(10):975-84.
- Hulsebosch CE, DeWitt DS, Jenkins LW, Prough DS. Traumatic brain injury in rats results in increased expression of Gap-43 that correlates with behavioral recovery. *Neurosci Lett*. 1998;255(2):83-6.
- Hultquist DE, Xu F, Quandt KS, Schlafer M, Mack CP, Till GO, Seekamp A, Betz AL, Ennis SR. Evidence that NADPH-dependent methemoglobin reductase and administered riboflavin protect tissues from oxidative injury. *Am J Hematol*. 1993;42(1):13-8.
- Hwang IK, Yoo KY, Kim do H, Lee BH, Kwon YG, Won MH. Time course of changes in pyridoxal 5'-phosphate (vitamin B6 active form) and its neuroprotection in experimental ischemic damage. *Exp Neurol*. 2007;206(1):114-25.
- Hynds DL, Snow DM. Neurite outgrowth inhibition by chondroitin sulfate proteoglycan: stalling/stopping exceeds turning in human neuroblastoma growth cones. *Exp Neurol*. 1999;160(1):244-55.
- Iaci JF, Vecchione AM, Zimmer MP, Caggiano AO. Chondroitin sulfate proteoglycans in spinal cord contusion injury and the effects of chondroitinase treatment. *J Neurotrauma*. 2007;24(11):1743-59.
- Inatani M, Honjo M, Otori Y, Oohira A, Kido N, Tano Y, Honda Y, Tanihara H. Inhibitory effects of neurocan and phosphacan on neurite outgrowth from retinal ganglion cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(8):1930-8.
- Ingelsson M, Fukumoto H, Newell KL, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Frosch MP, Albert MS, Hyman BT, Irizarry MC. Early Aβ accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology*. 2004;62(6):925-31.
- Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:609-52.
- Ishii K, Sarai K, Sanemori H, Kawasaki T. Concentrations of thiamine and its phosphate esters in rat tissues determined by high-performance liquid chromatography. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1979;25(6):517-23.

- Itokawa Y, Schulz RA, Cooper JR. Thiamine in nerve membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1972;266(1):293-9.
- Itokawa Y. Thiamine and nervous system function: an historical sketch. *Metab Brain Dis*. 1996;11(1):1-7.
- Jacobson RD, Virág I, Skene JH. A protein associated with axon growth, GAP-43, is widely distributed and developmentally regulated in rat CNS. *J Neurosci*. 1986;6(6):1843-55.
- Janać B, Pesić V, Peković S, Rakić L, Stojiljković M. The time-course of ribavirin-provoked changes of basal and AMPH-induced motor activities in rats. *Exp Brain Res*. 2005;165(3):402-6.
- Janezko K. Co-expression of GFAP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere. A combined autoradiographic and double immunocytochemical study. *Int J Dev Neurosci*. 1993;11(2):139-47.
- Jankowska-Kulawy A, Bielarczyk H, Pawełczyk T, Wróblewska M, Szutowicz A. Acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in nerve terminal compartment of thiamine deficient rat brain. *J Neurochem*. 2010;115(2):333-42.
- Jarvis SM, Thorn JA, Glue P. Ribavirin uptake by human erythrocytes and the involvement of nitrobenzylthioinosine-sensitive (es)-nucleoside transporters. *Br J Pharmacol*. 1998;123(8):1587-92.
- Jaworski DM, Kelly GM, Hockfield S. Intracranial injury acutely induces the expression of the secreted isoform of the CNS-specific hyaluronan-binding protein BEHAB/brevican. *Exp Neurol*. 1999;157(2):327-37.
- Johnson GV, Jope RS. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *J Neurosci Res*. 1992;33(4):505-12.
- Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2003b;182(2):399-411.
- Jones LL, Sajed D, Tuszynski MH. Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of permissiveness and inhibition. *J Neurosci*. 2003a;23(28):9276-88.
- Julien JP, Mushynski WE. Neurofilaments in health and disease. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1998;61:1-23.
- Kampfl A, Posmantur R, Nixon R, Grynspan F, Zhao X, Liu SJ, Newcomb JK, Clifton GL, Hayes RL. mu-calpain activation and calpain-mediated cytoskeletal proteolysis following traumatic brain injury. *J Neurochem*. 1996;67(4):1575-83.
- Kampfl A, Posmantur RM, Zhao X, Schmutzhard E, Clifton GL, Hayes RL. Mechanisms of calpain proteolysis following traumatic brain injury: implications for pathology and therapy: implications for pathology and therapy: a review and update. *J Neurotra*. 1997;14(3):121-34.
- Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, Kishino A, Kikuchi K, Shibata S, Okano HJ, et al. A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med*. 2006;12(12):1380-9.
- Kapfhammer JP. Axon sprouting in the spinal cord: growth promoting and growth inhibitory mechanisms. *Anat Embryol (Berl)*. 1997;196(6):417-26.
- Katoh-Semba R, Matsuda M, Kato K, Oohira A. Chondroitin sulphate proteoglycans in the rat brain: candidates for axon barriers of sensory neurons and the possible modification by laminin of their actions. *Eur J Neurosci*. 1995;7(4):613-21.
- Katoh-Semba R, Matsuda M, Watanabe E, Maeda N, Oohira A. Two types of brain chondroitin sulfate proteoglycan: their distribution and possible functions in the rat embryo. *Neurosci Res*. 1998;31(4):273-82.

- Keirstead HS, Levine JM, Blakemore WF. Response of the oligodendrocyte progenitor cell population (defined by NG2 labelling) to demyelination of the adult spinal cord. *Glia*. 1998;22(2):161-70.
- Kentsis A, Topisirovic I, Culjkovic B, Shao L, Borden KL. Ribavirin suppresses eIF4E-mediated oncogenic transformation by physical mimicry of the 7-methyl guanosine mRNA cap. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(52):18105-10.
- Kikuchi M, Kashii S, Honda Y, Tamura Y, Kaneda K, Akaike A. Protective effects of methylcobalamin, a vitamin B12 analog, against glutamate-induced neurotoxicity in retinal cell culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(5):848-54.
- Kim WR, Kim JY, Moon Y, Kim HJ, Kim H, Sun W. Regional difference of reactive astrogliosis following traumatic brain injury revealed by hGFAP-GFP transgenic mice. *Neurosci Lett*. 2012;513(2):155-9.
- King CE, Adlard PA, Dickson TC, Vickers JC. Neuronal response to physical injury and its relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000;27(7):548-52.
- King CE, Canty AJ, Vickers JC. Alterations in neurofilaments associated with reactive brain changes and axonal sprouting following acute physical injury to the rat neocortex. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2001;27(2):115-26.
- Klaidman LK, Mukherjee SK, Hutchin TP, Adams JD. Nicotinamide as a precursor for NAD⁺ prevents apoptosis in the mouse brain induced by tertiary-butylhydroperoxide. *Neurosci Lett*. 1996;206(1):5-8.
- Kolb B, Teskey GC. Age, experience, injury, and the changing brain. *Dev Psychobiol*. 2012;54(3):311-25.
- Kolb B. Synaptic plasticity and the organization of behaviour after early and late brain injury. *Can J Exp Psychol*. 1999;53(1):62-76.
- Komitova M, Serwanski DR, Lu QR, Nishiyama A. NG2 cells are not a major source of reactive astrocytes after neocortical stab wound injury. *Glia*. 2011;59(5):800-9.
- Korshunova I, Novitskaya V, Kiryushko D, Pedersen N, Kolkova K, Kropotova E, Mosevitsky M, Rayko M, Morrow JS, Ginzburg I, Berezin V, Bock E. GAP-43 regulates NCAM-180-mediated neurite outgrowth. *J Neurochem*. 2007;100(6):1599-612.
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996;19(8):312-8.
- Ksendzova GA, Sorokin VL, Edimecheva IP, Shadyro OI. Reactions of arylamine and aminophenol derivatives, and riboflavin with organic radicals. *Free Radic Res*. 2004;38(11):1183-90.
- Kurazono S, Okamoto M, Sakiyama J, Mori S, Nakata Y, Fukuoka J, Amano S, Oohira A, Matsui H. Expression of brain specific chondroitin sulfate proteoglycans, neurocan and phosphacan, in the developing and adult hippocampus of Ihara's epileptic rats. *Brain Res*. 2001;898(1):36-48.
- Kuypers NJ, Hoane MR. Pyridoxine administration improves behavioral and anatomical outcome after unilateral contusion injury in the rat. *J Neurotrauma*. 2010;27(7):1275-82.
- Kwok JC, Afshari F, García-Álías G, Fawcett JW. Proteoglycans in the central nervous system: plasticity, regeneration and their stimulation with chondroitinase ABC. *Restor Neurol Neurosci*. 2008;26(2-3):131-45.
- Langlais PJ, Zhang SX. Cortical and subcortical white matter damage without Wernicke's encephalopathy after recovery from thiamine deficiency in the rat. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997;21(3):434-43.
- Langlais PJ, Zhang SX. Extracellular glutamate is increased in thalamus during thiamine deficiency-induced lesions and is blocked by MK-801. *J Neurochem*. 1993 Dec;61(6):2175-82.

- Latov N, Nilaver G, Zimmerman EA, Johnson WG, Silverman AJ, Defendini R, Cote L. Fibrillary astrocytes proliferate in response to brain injury: a study combining immunoperoxidase technique for glial fibrillary acidic protein and radioautography of tritiated thymidine. *Dev Biol.* 1979;72(2):381-4.
- Lavrence, F. E. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years, *Neuroch. Res.* 2000;25:1439-51.
- Lavrnja I, Savic D, Bjelobaba I, Dacic S, Bozic I, Parabucki A, Nedeljkovic N, Pekovic S, Rakic L, Stojiljkovic M. The effect of ribavirin on reactive astrogliosis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Pharmacol Sci.* 2012;119(3):221-32.
- Lavrnja I, Trifunovic S, Ajdzanovic V, Pekovic S, Bjelobaba I, Stojiljkovic M, Milosevic V. Sensorimotor cortex ablation induces time-dependent response of ACTH cells in adult rats: behavioral, immunohistomorphometric and hormonal study. *Physiology & Behavior* 2013; (in press).
- Lazarides E. Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Annu Rev Biochem.* 1982;51:219-50.
- Lee MK, Xu Z, Wong PC, Cleveland DW. Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo. *J Cell Biol.* 1993;122(6):1337-50.
- Lemons ML, Howland DR, Anderson DK. Chondroitin sulfate proteoglycan immunoreactivity increases following spinal cord injury and transplantation. *Exp Neurol.* 1999;160(1):51-65.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* 1990;60(4):585-95.
- Levine JM, Stincone F, Lee YS. Development and differentiation of glial precursor cells in the rat cerebellum. *Glia.* 1993;7(4):307-21.
- Levine JM. Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. *J Neurosci.* 1994;14(8):4716-30.
- Lewis SA, Balcarek JM, Krek V, Shelanski M, Cowan NJ. Sequence of a cDNA clone encoding mouse glial fibrillary acidic protein: structural conservation of intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(9):2743-6.
- Lewis SA, Cowan NJ. Temporal expression of mouse glial fibrillary acidic protein mRNA studied by a rapid in situ hybridization procedure. *J Neurochem.* 1985;45(3):913-9.
- Li GL, Farooque M, Lewen A, Lennmyr F, Holtz A, Olsson Y. MAP2 and neurogranin as markers for dendritic lesions in CNS injury. An immunohistochemical study in the rat. *APMIS.* 2000;108(2):98-106.
- Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, et al. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(3):468-81.
- Li Y, Jiang N, Powers C, Chopp M. Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 1998;29(9):1972-80.
- Liedtke W, Edelmann W, Chiu FC, Kucherlapati R, Raine CS. Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking glial fibrillary acidic protein is characterized by a more severe clinical course and an infiltrative central nervous system lesion. *Am J Pathol.* 1998;152(1):251-9.
- Lin Y, Desbois A, Jiang S, Hou ST. Group B vitamins protect murine cerebellar granule cells from glutamate/NMDA toxicity. *Neuroreport.* 2004;15(14):2241-4.
- Lindå H, Piehl F, Dagerlind A, Verge VM, Arvidsson U, Cullheim S, Risling M, Ulfhake B, Hökfelt T. Expression of GAP-43 mRNA in the adult mammalian spinal cord under normal conditions and after different types of lesions, with special reference to motoneurons. *Exp Brain Res.* 1992;91(2):284-95.

- Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, Arnelle DR, Stamler JS. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(11):5923-8.
- Liu Q, Xie F, Alvarado-Diaz A, Smith MA, Moreira PI, Zhu X, Perry G. Neurofilamentopathy in neurodegenerative diseases. *Open Neurol J*. 2011;5:58-62.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
- Logan A, Frautschy SA, Gonzalez AM, Sporn MB, Baird A. Enhanced expression of transforming growth factor beta 1 in the rat brain after a localized cerebral injury. *Brain Res*. 1992;587(2):216-25.
- Loncarevic-Vasiljkovic N, Pesic V, Todorovic S, Popic J, Smiljanic K, Milanovic D, Ruzdijic S, Kanazir S. Caloric restriction suppresses microglial activation and prevents neuroapoptosis following cortical injury in rats. *PloS One*. 2012;7(5):e37215.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
- Magistretti PJ. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *Exp Physiol*. 2011;96(4):407-10.
- Magnus T, Carmen J, Deleon J, Xue H, Pardo AC, Lepore AC, Mattson MP, Rao MS, Maragakis NJ. Adult glial precursor proliferation in mutant SOD1G93A mice. *Glia*. 2008;56(2):200-8.
- Maiese K, Chong ZZ, Hou J, Shang YC. The vitamin nicotinamide: translating nutrition into clinical care. *Molecules*. 2009;14(9):3446-85.
- Makwana M, Jones LL, Cuthill D, Heuer H, Bohatschek M, Hristova M, Friedrichsen S, Ormsby I, Bueringer D, Koppius A, Bauer K, Doetschman T, Raivich G. Endogenous transforming growth factor beta 1 suppresses inflammation and promotes survival in adult CNS. *J Neurosci*. 2007;27(42):11201-13.
- Margolis RK, Rauch U, Maurel P, Margolis RU. Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspect Dev Neurobiol*. 1996;3(4):273-90.
- Markland W, McQuaid TJ, Jain J, Kwong AD. Broad-spectrum antiviral activity of the IMP dehydrogenase inhibitor VX-497: a comparison with ribavirin and demonstration of antiviral additivity with alpha interferon. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(4):859-66.
- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem*. 1978;87(1):206-10.
- Martin PR, Singleton CK, Hiller-Sturmhöfel S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. *Alcohol Res Health*. 2003;27(2):134-42.
- Masliah E, Fagan AM, Terry RD, DeTeresa R, Mallory M, Gage FH. Reactive synaptogenesis assessed by synaptophysin immunoreactivity is associated with GAP-43 in the dentate gyrus of the adult rat. *Exp Neurol*. 1991;113(2):131-42.
- Masliah E, Terry R. The role of synaptic proteins in the pathogenesis of disorders of the central nervous system. *Brain Pathol*. 1993;3(1):77-85.
- Masliah E, Terry RD, DeTeresa RM, Hansen LA. Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease. *Neurosci Lett*. 1989;103(2):234-9.
- Massey JM, Hubscher CH, Wagoner MR, Decker JA, Ams J, Silver J, Onifer SM. Chondroitinase ABC digestion of the perineuronal net promotes functional collateral sprouting in the cuneate nucleus after cervical spinal cord injury. *J Neurosci*. 2006;26(16):4406-14.
- Matsuda T, Cooper JR. Thiamine as an integral component of brain synaptosomal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(9):5886-9.

- Matsui F, Kawashima S, Shuo T, Yamauchi S, Tokita Y, Aono S, Keino H, Oohira A. Transient expression of juvenile-type neurocan by reactive astrocytes in adult rat brains injured by kainate-induced seizures as well as surgical incision. *Neuroscience*. 2002;112(4):773-81.
- Matsui F, Watanabe E, Oohira A. Immunological identification of two proteoglycan fragments derived from neurocan, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan. *Neurochem Int*. 1994;25(5):425-31.
- Matthews RT, Kelly GM, Zerillo CA, Gray G, Tiemeyer M, Hockfield S. Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *J Neurosci*. 2002;22(17):7536-47.
- Matus A. Neurofilament protein phosphorylation--where, when and why. *Trends Neurosci*. 1988;11(7):291-2.
- Maurel P, Rauch U, Flad M, Margolis RK, Margolis RU. Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(7):2512-6.
- Mayer J, Hamel MG, Gottschall PE. Evidence for proteolytic cleavage of brevicin by the ADAMTSs in the dentate gyrus after excitotoxic lesion of the mouse entorhinal cortex. *BMC Neurosci*. 2005;6:52.
- Maynard KI, Ayoub IA, Shen CC. Delayed multidose treatment with nicotinamide extends the degree and duration of neuroprotection by reducing infarction and improving behavioral scores up to two weeks following transient focal cerebral ischemia in Wistar rats. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;939:416-24.
- McCormick DB, Greene HL. 1994. Vitamins. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia: Saunders.
- McCormick DB. 1994. Riboflavin. In: Shils ME, Olson JE, Shike M, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Philadelphia: Lea & Febiger. Pp. 366-375.
- McGuire CB, Snipes GJ, Norden JJ. Light-microscopic immunolocalization of the growth- and plasticity-associated protein GAP-43 in the developing rat brain. *Brain Res*. 1988;469(1-2):277-91.
- McKeon RJ, Höke A, Silver J. Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp Neurol*. 1995;136(1):32-43.
- McKeon RJ, Jurynek MJ, Buck CR. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci*. 1999;19(24):10778-88.
- McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci*. 1991;11(11):3398-411.
- McKerracher L, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron*. 1994;13(4):805-11.
- McKinney RA, Debanne D, Gähwiler BH, Thompson SM. Lesion-induced axonal sprouting and hyperexcitability in the hippocampus in vitro: implications for the genesis of posttraumatic epilepsy. *Nat Med*. 1997;3(9):990-6.
- McMillian MK, Thai L, Hong JS, O'Callaghan JP, Pennypacker KR. Brain injury in a dish: a model for reactive gliosis. *Trends Neurosci*. 1994;17(4):138-42.
- McTigue DM, Popovich PG, Morgan TE, Stokes BT. Localization of transforming growth factor-beta1 and receptor mRNA after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2000;163(1):220-30.

- McTigue DM, Wei P, Stokes BT. Proliferation of NG2-positive cells and altered oligodendrocyte numbers in the contused rat spinal cord. *J Neurosci*. 2001;21(10):3392-400.
- Meberg PJ, Routtenberg A. Selective expression of protein F1/(GAP-43) mRNA in pyramidal but not granule cells of the hippocampus. *Neuroscience*. 1991;45(3):721-33.
- Meng H, Walker N, Su Y, Qiao X. Stargazin mutation impairs cerebellar synaptogenesis, synaptic maturation and synaptic protein distribution. *Brain Res*. 2006;1124(1):197-207.
- Mercken M, Lübke U, Vandermeeren M, Gheuens J, Oestreicher AB. Immunocytochemical detection of the growth-associated protein B-50 by newly characterized monoclonal antibodies in human brain and muscle. *J Neurobiol*. 1992;23(3):309-21.
- Merrill AH Jr, Lambeth JD, Edmondson DE, McCormick DB. Formation and mode of action of flavoproteins. *Annu Rev Nutr*. 1981;1:281-317.
- Merrill JE. Tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 and related cytokines in brain development: normal and pathological. *Dev Neurosci*. 1992;14(1):1-10.
- Meyer-Puttlitz B, Junker E, Margolis RU, Margolis RK. Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. II. Immunocytochemical localization of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol*. 1996;366(1):44-54.
- Milev P, Chiba A, Häring M, Rauvala H, Schachner M, Ranscht B, Margolis RK, Margolis RU. High affinity binding and overlapping localization of neurocan and phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta with tenascin-R, amphoterin, and the heparin-binding growth-associated molecule. *J Biol Chem*. 1998;273(12):6998-7005.
- Milev P, Friedlander DR, Sakurai T, Karthikeyan L, Flad M, Margolis RK, Grumet M, Margolis RU. Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol*. 1994;127(6 Pt 1):1703-15.
- Milicevic I, Pekovic S, Subasic S, Mostarica-Stojkovic M, Stosic-Grujicic S, Medic-Mijacevic L, Pejanovic V, Rakic L, Stojiljkovic M. Ribavirin reduces clinical signs and pathological changes of experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats. *J Neurosci Res*. 2003;72(2):268-78.
- Miller RH, Abney ER, David S, French-Constant C, Lindsay R, Patel R, Stone J, Raff MC. Is reactive gliosis a property of a distinct subpopulation of astrocytes? *J Neurosci*. 1986;6(1):22-9.
- Mokudai T, Ayoub IA, Sakakibara Y, Lee EJ, Ogilvy CS, Maynard KI. Delayed treatment with nicotinamide (Vitamin B(3)) improves neurological outcome and reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in Wistar rats. *Stroke*. 2000;31(7):1679-85.
- Moon LD, Asher RA, Rhodes KE, Fawcett JW. Relationship between sprouting axons, proteoglycans and glial cells following unilateral nigrostriatal axotomy in the adult rat. *Neuroscience*. 2002;109(1):101-17.
- Moon LD, Brecknell JE, Franklin RJ, Dunnett SB, Fawcett JW. Robust regeneration of CNS axons through a track depleted of CNS glia. *Exp Neurol*. 2000;161(1):49-66.
- Moon LD, Fawcett JW. Reduction in CNS scar formation without concomitant increase in axon regeneration following treatment of adult rat brain with a combination of antibodies to TGFbeta1 and beta2. *Eur J Neurosci*. 2001;14(10):1667-77.
- Moreau-Fauvarque C, Kumanogoh A, Camand E, Jaillard C, Barbin G, Boquet I, Love C, Jones EY, Kikutani H, Lubetzki C, Dusart I, Chédotal A. The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *J Neurosci*. 2003;23(27):9229-39.
- Moretto G, Xu RY, Monaco S, Rizzuto N, Kim SU. Expression and distribution of GAP-43 in human astrocytes in culture. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1995;21(4):362-7.
- Morgenstern DA, Asher RA, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog Brain Res*. 2002;137:313-32.

- Mukherjee SK, Adams JD Jr. The effects of aging and neurodegeneration on apoptosis-associated DNA fragmentation and the benefits of nicotinamide. *Mol Chem Neuropathol*. 1997;32(1-3):59-74.
- Mulholland PJ. Susceptibility of the cerebellum to thiamine deficiency. *Cerebellum*. 2006;5(1):55-63.
- Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew MV. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain*. 2006;129(Pt 10):2761-72.
- Nadanaka S, Clement A, Masayama K, Faissner A, Sugahara K. Characteristic hexasaccharide sequences in octasaccharides derived from shark cartilage chondroitin sulfate D with a neurite outgrowth promoting activity. *J Biol Chem*. 1998;273(6):3296-307.
- Nandini CD, Sugahara K. Role of the sulfation pattern of chondroitin sulfate in its biological activities and in the binding of growth factors. *Adv Pharmacol*. 2006;53:253-79.
- Narayan RK, Michel ME, Ansell B, Baethmann A, Biegon A, Bracken MB, et al. Clinical trials in head injury. *J Neurotrauma*. 2002;19(5):503-57.
- Nathaniel, E.J.H.. The reactive astrocyte. *Adv. Cell Neurobiol*. 1981;2:249-301.
- Navone F, Jahn R, Di Gioia G, Stukenbrok H, Greengard P, De Camilli P. Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J Cell Biol*. 1986;103(6 Pt 1):2511-27.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci*. 2003;26(10):523-30.
- Neumann S, Woolf CJ. Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury. *Neuron*. 1999;23(1):83-91.
- Neve RL, Finch EA, Bird ED, Benowitz LI. Growth-associated protein GAP-43 is expressed selectively in associative regions of the adult human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 May;85(10):3638-42.
- Nixon RA, Lewis SE, Marotta CA. Posttranslational modification of neurofilament proteins by phosphate during axoplasmic transport in retinal ganglion cell neurons. *J Neurosci*. 1987;7(4):1145-58.
- Nixon RA, Shea TB. Dynamics of neuronal intermediate filaments: a developmental perspective. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1992;22(2):81-91.
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res*. 1979;161(2):303-10.
- Norton WT, Aquino DA, Hozumi I, Chiu FC, Brosnan CF. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem Res*. 1992;17(9):877-85.
- Nudo RJ. Adaptive plasticity in motor cortex: implications for rehabilitation after brain injury. *J Rehabil Med*. 2003;(41 Suppl):7-10.
- O'Connor WT, Smyth A, Gilchrist MD. Animal models of traumatic brain injury: a critical evaluation. *Pharmacol Ther*. 2011;130(2):106-13.
- Oestreicher AB, Gispén WH. Comparison of the immunocytochemical distribution of the phosphoprotein B-50 in the cerebellum and hippocampus of immature and adult rat brain. *Brain Res*. 1986;375(2):267-79.
- Ogata K, Kosaka T. Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience*. 2002;113(1):221-33.
- Ohab JJ, Carmichael ST. Poststroke neurogenesis: emerging principles of migration and localization of immature neurons. *Neuroscientist*. 2008;14(4):369-80.
- Ohlsson AL, Johansson BB. Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats. *Stroke*. 1995;26(4):644-9.
- Oka T. Modulation of gene expression by vitamin B6. *Nutr Res Rev*. 2001; (2):257-66.

- Okada K, Tanaka H, Temporin K, Okamoto M, Kuroda Y, Moritomo H, Murase T, Yoshikawa H. Methylcobalamin increases Erk1/2 and Akt activities through the methylation cycle and promotes nerve regeneration in a rat sciatic nerve injury model. *Exp Neurol*. 2010;222(2):191-203.
- Okada M, Ishikawa K, Watanabe K. Effect of vitamin B6 deficiency on glycogen metabolism in the skeletal muscle, heart, and liver of rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1991;37(4):349-57.
- Olsen ML, Sontheimer H. Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K⁺ buffering to cell differentiation. *J Neurochem*. 2008;107(3):589-601.
- Oohira A, Matsui F, Tokita Y, Yamauchi S, Aono S. Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development. *Arch Biochem Biophys*. 2000;374(1):24-34.
- Oohira A, Shuo T, Tokita Y, Nakanishi K, Aono S. Neuroglycan C, a brain-specific part-time proteoglycan, with a particular multidomain structure. *Glycoconj J*. 2004;21(1-2):53-7.
- Osborn M, Weber K. Cytoskeletal proteins in tumor diagnosis. *Curr. Comm. In Mol Biol*. 1989 Cold Spring Harbor Press.
- Pankiewicz KW. Inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase as potential chemotherapeutic agents. *Exp Opin Ther Patents*. 1999;9:55-65.
- Pant HC. Dephosphorylation of neurofilament proteins enhances their susceptibility to degradation by calpain. *Biochem J*. 1988 Dec 1;256(2):665-8.
- Parabucki A, Santrač A, Savić D, Dacić S, Bjelobaba I, Peković S, Stojiljković M. Real-time PCR and immunocytochemical study of chondroitin sulfate proteoglycans after scratch wounding in cultured astrocytes. *J Med Biochem*. 2013. (in press).
- Parabucki AB, Božić ID, Bjelobaba IM, Lavrnja IC, Brkić PD, Jovanović TS, Savić DZ, Stojiljković MB, Peković SM. Hyperbaric oxygenation alters temporal expression pattern of superoxide dismutase 2 after cortical stab injury in rats. *Croat Med J*. 2012;53(6):586-97.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier; NY: 2005.
- Pearlson GD, Robinson RG. Suction lesions of the frontal cerebral cortex in the rat induce asymmetrical behavioral and catecholaminergic responses. *Brain Res*. 1981;218(1-2):233-42.
- Pekny M, Levéen P, Pekna M, Eliasson C, Berthold CH, Westermarck B, Betsholtz C. Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. *EMBO J*. 1995;14(8):1590-8.
- Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. 2005;50(4):427-34.
- Pekny M, Pekna M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol*. 2004;204(4):428-37.
- Pekovic S, Subasic S, Nedeljkovic N, Bjelobaba I, Filipovic R, Milenkovic I, Lavrnja I, Stojkov D, Jovanovic S, Rakic Lj, Stojiljkovic M. *Molecular Basis of Brain Injury and Repair*. In : *Neurobiological Studies – From Genes to Behaviour*. 2006: ISBN: 81-308-0107-8 (Eds: S. Ruzdijic and Lj. Rakic) Research Signpost, Kerala, India,143-165.
- Pekovich SR, Martin PR, Singleton CK. Thiamine deficiency decreases steady-state transketolase and pyruvate dehydrogenase but not alpha-ketoglutarate dehydrogenase mRNA levels in three human cell types. *J Nutr*. 1998;128(4):683-7.
- Peković S, Filipović R, Subasić S, Lavrnja I, Stojkov D, Nedeljković N, Rakić L, Stojiljković M. Downregulation of glial scarring after brain injury: the effect of purine nucleoside analogue ribavirin. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1048:296-310.
- Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*. 2009;32(8):421-31.

- Perrin FE, Boisset G, Docquier M, Schaad O, Descombes P, Kato AC. No widespread induction of cell death genes occurs in pure motoneurons in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Hum Mol Genet.* 2005;14(21):3309-20.
- Perry TA, Weerasuriya A, Mouton PR, Holloway HW, Greig NH. Pyridoxine-induced toxicity in rats: a stereological quantification of the sensory neuropathy. *Exp Neurol.* 2004;190(1):133-44.
- Perry VH, Brown MC. Role of macrophages in peripheral nerve degeneration and repair. *Bioessays.* 1992;14(6):401-6.
- Peters A, Palay SL, Webster HD. 1991. The fine structure of the nervous system, Third edn. Oxford University Press, New York
- Petzold A. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci.* 2005;233(1-2):183-98.
- Pixley SK, de Vellis J. Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res.* 1984;317(2):201-9.
- Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science.* 2002;298(5596):1248-51.
- Posmantur R, Hayes RL, Dixon CE, Taft WC. Neurofilament 68 and neurofilament 200 protein levels decrease after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 1994;11(5):533-45.
- Posmantur R, Kampfl A, Siman R, Liu J, Zhao X, Clifton GL, Hayes RL. A calpain inhibitor attenuates cortical cytoskeletal protein loss after experimental traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience.* 1997;77(3):875-88.
- Posmantur R, Kampfl A, Siman R, Liu J, Zhao X, Clifton GL, Hayes RL. A calpain inhibitor attenuates cortical cytoskeletal protein loss after experimental traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience.* 1997;77(3):875-88.
- Posmantur RM, Kampfl A, Liu SJ, Heck K, Taft WC, Clifton GL, Hayes RL. Cytoskeletal derangements of cortical neuronal processes three hours after traumatic brain injury in rats: an immunofluorescence study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996b;55(1):68-80.
- Posmantur RM, Kampfl A, Taft WC, Bhattacharjee M, Dixon CE, Bao J, Hayes RL. Diminished microtubule-associated protein 2 (MAP2) immunoreactivity following cortical impact brain injury. *J Neurotrauma.* 1996a Mar;13(3):125-37.
- Posmantur RM, Newcomb JK, Kampfl A, Hayes RL. Light and confocal microscopic studies of evolutionary changes in neurofilament proteins following cortical impact injury in the rat. *Exp Neurol.* 2000;161(1):15-26.
- Posmantur RM, Zhao X, Kampfl A, Clifton GL, Hayes RL. Immunoblot analyses of the relative contributions of cysteine and aspartic proteases to neurofilament breakdown products following experimental brain injury in rats. *Neurochem Res.* 1998;23(10):1265-76.
- Poulain FE, Sobel A. The microtubule network and neuronal morphogenesis: Dynamic and coordinated orchestration through multiple players. *Mol Cell Neurosci.* 2010;43(1):15-32.
- Properzi F, Asher RA, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans in the central nervous system: changes and synthesis after injury. *Biochem Soc Trans.* 2003;31(2):335-6.
- Properzi F, Carulli D, Asher RA, Muir E, Camargo LM, van Kuppevelt TH, ten Dam GB, Furukawa Y, Mikami T, Sugahara K, Toida T, Geller HM, Fawcett JW. Chondroitin 6-sulphate synthesis is up-regulated in injured CNS, induced by injury-related cytokines and enhanced in axon-growth inhibitory glia. *Eur J Neurosci.* 2005;21(2):378-90.
- Properzi F, Fawcett JW. Proteoglycans and brain repair. *News Physiol Sci.* 2004;19:33-8.
- Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol.* 1982;11(5):491-8.

- Quigley A, Tan AA, Hoane MR. The effects of hypertonic saline and nicotinamide on sensorimotor and cognitive function following cortical contusion injury in the rat. *Brain Res.* 2009;1304:138-48.
- Raabe TD, Nguyen T, Archer C, Bittner GD. Mechanisms for the maintenance and eventual degradation of neurofilament proteins in the distal segments of severed goldfish mauthner axons. *J Neurosci.* 1996;16(5):1605-13.
- Rabchevsky AG, Streit WJ. Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *J Neurosci Res.* 1997;47(1):34-48.
- Raghupathi R. Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathol.* 2004;14(2):215-22.
- Rajadhyaksha M S, Manghani D. Part 2. Astrocytes – Star Performers in the Neronal Tissue. *Resonance.* 2002;7(1):25-26.
- Ramic M, Emerick AJ, Bollnow MR, O'Brien TE, Tsai SY, Kartje GL. Axonal plasticity is associated with motor recovery following amphetamine treatment combined with rehabilitation after brain injury in the adult rat. *Brain Res.* 2006;1111(1):176-86.
- Rao J, Oz G, Seaquist ER. Regulation of cerebral glucose metabolism. *Minerva Endocrinol.* 2006;31(2):149-58.
- Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW, Andrew C, Herman MA, Reed JK, Ciccarelli R, Di Iorio P, Caciagli F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol.* 1999;59(6):663-90.
- Rauch U, Feng K, Zhou XH. Neurocan: a brain chondroitin sulfate proteoglycan. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(12-13):1842-56.
- Rauch U, Hirakawa S, Oohashi T, Kappler J, Roos G. Cartilage link protein interacts with neurocan, which shows hyaluronan binding characteristics different from CD44 and TSG-6. *Matrix Biol.* 2004;22(8):629-39.
- Rauch U, Karthikeyan L, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK. Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain. *J Biol Chem.* 1992;267(27):19536-47.
- Rauch U. Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(16):2031-45.
- Rauch U. Modeling an extracellular environment for axonal pathfinding and fasciculation in the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 1997;290(2):349-56.
- Reier PJ, Stensaas LJ, Guth L. 1983. The astrocytic scar as an impediment to regeneration in the central nervous system. In: Kao, C. C.; Bunge, R. P.; Reier, P. J., eds. *Spinal cord reconstruction*. New York: Raven Press:163–195.
- Rekart JL, Meiri K, Routtenberg A. Hippocampal-dependent memory is impaired in heterozygous GAP-43 knockout mice. *Hippocampus.* 2005;15(1):1-7.
- Rhodes KE, Raivich G, Fawcett JW. The injury response of oligodendrocyte precursor cells is induced by platelets, macrophages and inflammation-associated cytokines. *Neuroscience.* 2006;140(1):87-100.
- Richardson PM, Issa VM, Aguayo AJ. Regeneration of long spinal axons in the rat. *J Neurocytol.* 1984;13(1):165-82.
- Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ. Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature.* 1980;284(5753):264-5.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 1997;20(12):570-7.
- Risau W, Wolburg H. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 1990;13(5):174-8.

- Rivlin RS. Riboflavin. In: E.E. Zeigler, L.J. Filer (Eds.), *Present Knowledge in Nutrition*, ILSI Press, Washington, DC, 1996, pp. 167–173.
- Roberts E., Wein J., Simonsen DJ. Gamma-aminobutyric acid (GABA), vitamin B₆ and neuronal function. *Vitam Horm.* 1964;22:503-59.
- Rolls A, Shechter R, Schwartz M. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(3):235-41.
- Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech.* 2003;60(6):614-32.
- Routtenberg A, Cantalops I, Zaffuto S, Serrano P, Namgung U. Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(13):7657-62.
- Ruoslahti E. Brain extracellular matrix. *Glycobiology.* 1996;6(5):489-92.
- Ruoslahti E. Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol.* 1988;4:229-55.
- Russmann S, Grattagliano I, Portincasa P, Palmieri VO, Palasciano G. Ribavirin-induced anemia: mechanisms, risk factors and related targets for future research. *Curr Med Chem.* 2006;13(27):3351-7.
- Saatman KE, Duhaime AC, Bullock R, Maas AI, Valadka A, Manley GT; Workshop Scientific Team and Advisory Panel Members. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *J Neurotrauma.* 2008;25(7):719-38.
- Saatman KE, Graham DI, McIntosh TK. The neuronal cytoskeleton is at risk after mild and moderate brain injury. *J Neurotrauma.* 1998;15(12):1047-58.
- Saatman KE, Murai H, Bartus RT, Smith DH, Hayward NJ, Perri BR, McIntosh TK. Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(8):3428-33.
- Sakakibara Y, Mitha AP, Ayoub IA, Ogilvy CS, Maynard KI. Delayed treatment with nicotinamide (vitamin B₃) reduces the infarct volume following focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats, diabetic and non-diabetic Fischer 344 rats. *Brain Res.* 2002;931(1):68-73.
- Sakakibara Y, Mitha AP, Ogilvy CS, Maynard KI. Post-treatment with nicotinamide (vitamin B₃) reduces the infarct volume following permanent focal cerebral ischemia in female Sprague-Dawley and Wistar rats. *Neurosci Lett.* 2000;281(2-3):111-4.
- Sakurai T, Friedlander DR, Grumet M. Expression of polypeptide variants of receptor-type protein tyrosine phosphatase beta: the secreted form, phosphacan, increases dramatically during embryonic development and modulates glial cell behavior in vitro. *J Neurosci Res.* 1996;43(6):694-706.
- Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan A. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia.* 2004;46(3):225-51.
- Sato M, Chang E, Igarashi T, Noble LJ. Neuronal injury and loss after traumatic brain injury: time course and regional variability. *Brain Res.* 2001;917(1):45-54
- Schachner M, Hedley-Whyte ET, Hsu DW, Schoonmaker G, Bignami A. Ultrastructural localization of glial fibrillary acidic protein in mouse cerebellum by immunoperoxidase labeling. *J Cell Biol.* 1977;75(1):67-73.
- Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology.* 2000;39(5):777-87.
- Scheff SW, Price DA, Hicks RR, Baldwin SA, Robinson S, Brackney C. Synaptogenesis in the hippocampal CA1 field following traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2005;22(7):719-32.

- Schiffer D, Giordana MT, Migheli A, Giaccone G, Pezzotta S, Mauro A. Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. *Brain Res.* 1986;374(1):110-8.
- Schipke CG, Kettenmann H. Astrocyte responses to neuronal activity. *Glia.* 2004;47(3):226-32.
- Schmalfeldt M, Bandtlow CE, Dours-Zimmermann MT, Winterhalter KH, Zimmermann DR. Brain derived versican V2 is a potent inhibitor of axonal growth. *J Cell Sci.* 2000;113(Pt5):807-16.
- Schmalfeldt M, Dours-Zimmermann MT, Winterhalter KH, Zimmermann DR. Versican V2 is a major extracellular matrix component of the mature bovine brain. *J Biol Chem.* 1998;273(25):15758-64.
- Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 2000;874(2):123-30.
- Schnädelbach O, Mandl C, Faissner A. Expression of DSD-1-PG in primary neural and glial-derived cell line cultures, upregulation by TGF-beta, and implications for cell-substrate interactions of the glial cell line Oli-neu. *Glia.* 1998;23(2):99-119.
- Schöller K, Zausinger S, Baethmann A, Schmid-Elsaesser R. Neuroprotection in ischemic stroke--combination drug therapy and mild hypothermia in a rat model of permanent focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 2004;1023(2):272-8.
- Seiden LS, Sabol KE, Ricaurte GA. Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1993;33:639-77.
- Seidenbecher CI, Gundelfinger ED, Böckers TM, Trotter J, Kreutz MR. Transcripts for secreted and GPI-anchored brevicin are differentially distributed in rat brain. *Eur J Neurosci.* 1998;10(5):1621-30.
- Semchenko VV, Bogolepov NN, Stepanov SS, Maksimishin SV, Khizhnyak AS. Synaptic plasticity of the neocortex of white rats with diffuse-focal brain injuries. *Neurosci Behav Physiol.* 2006;36(6):613-8.
- Sharma N, Kress Y, Shafit-Zagardo B. Antisense MAP-2 oligonucleotides induce changes in microtubule assembly and neuritic elongation in pre-existing neurites of rat cortical neurons. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1994;27(3):234-47.
- Sharp T, Zetterström T, Ljungberg T, Ungerstedt U. A direct comparison of amphetamine-induced behaviours and regional brain dopamine release in the rat using intracerebral dialysis. *Brain Res.* 1987;401(2):322-30.
- Shea TB, Chan WK, Kushkuley J, Lee S. Organizational dynamics, functions, and pathobiological dysfunctions of neurofilaments. *Results Probl Cell Differ.* 2009;48:29-45.
- Sherman LS, Back SA. A 'GAG' reflex prevents repair of the damaged CNS. *Trends Neurosci.* 2008;31(1):44-52.
- Shojo H, Kibayashi K. Changes in localization of synaptophysin following fluid percussion injury in the rat brain. *Brain Res.* 2006;1078(1):198-211.
- Sibson NR, Lowe JP, Blamire AM, Martin MJ, Obrenovitch TP, Anthony DC. Acute astrocyte activation in brain detected by MRI: new insights into T(1) hypointensity. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(3):621-32.
- Siebert G, Gessner B, Klasser M. Energy supply of the central nervous system. *Bibl Nutr Dieta.* 1986;(38):1-26.
- Sihag RK, Inagaki M, Yamaguchi T, Shea TB, Pant HC. Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp Cell Res.* 2007;313(10):2098-109.
- Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(2):146-56.

- Simard M, Nedergaard M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*. 2004;129(4):877-96.
- Skene JH, Willard M. Characteristics of growth-associated polypeptides in regenerating toad retinal ganglion cell axons. *J Neurosci*. 1981;1(4):419-26.
- Slekar KH, Kosman DJ, Culotta VC. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *J Biol Chem*. 1996;271(46):28831-6.
- Smith GM, Strunz C. Growth factor and cytokine regulation of chondroitin sulfate proteoglycans by astrocytes. *Glia*. 2005;52(3):209-18.
- Snow DM, Brown EM, Letourneau PC. Growth cone behavior in the presence of soluble chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG), compared to behavior on CSPG bound to laminin or fibronectin. *Int J Dev Neurosci*. 1996;14(3):331-49.
- Snow DM, Mullins N, Hynds DL. Nervous system-derived chondroitin sulfate proteoglycans regulate growth cone morphology and inhibit neurite outgrowth: a light, epifluorescence, and electron microscopy study. *Micr Res Tech*. 2001;54(5):273-86.
- Soblosky JS, Colgin LL, Chorney-Lane D, Davidson JF, Carey ME. Some functional recovery and behavioral sparing occurs independent of task-specific practice after injury to the rat's sensorimotor cortex. *Behav Brain Res*. 1997;89(1-2):51-9.
- Soblosky JS, Matthews MA, Davidson JF, Tabor SL, Carey ME. Traumatic brain injury of the forelimb and hindlimb sensorimotor areas in the rat: physiological, histological and behavioral correlates. *Behav Brain Res*. 1996;79(1-2):79-92.
- Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*. 2009;32(12):638-47.
- Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist*. 2005;11(5):400-7.
- Soriano V, Vispo E, Martin-Carbonero L, Labarga P, Garcia-Samaniego J, Barreiro P. Management and therapy of chronic hepatitis C in HIV. *Curr Opin HIV AIDS*. 2007;2(6):482-8.
- Stallcup WB. The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J Neurocytol*. 2002;31(6-7):423-35.
- Stanley JL, Lincoln RJ, Brown TA, McDonald LM, Dawson GR, Reynolds DS. The mouse beam walking assay offers improved sensitivity over the mouse rotarod in determining motor coordination deficits induced by benzodiazepines. *J Psychopharmacol*. 2005;19(3):221-7.
- Stierum RH, van Herwijnen MH, Hageman GJ, Kleinjans JC. Increased poly(ADP-ribose) polymerase activity during repair of (+/-)-anti-benzo[a]pyrenediolepoxide-induced DNA damage in human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Carcinogenesis*. 1994;15(4):745-51.
- Straube-West K, Loomis PA, Opal P, Goldman RD. Alterations in neural intermediate filament organization: functional implications and the induction of pathological changes related to motor neuron disease. *J Cell Sci*. 1996;109 (Pt 9):2319-29.
- Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Increase in synaptophysin immunoreactivity following cortical infarction. *Neurosci Lett*. 1992;147(1):21-4.
- Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke*. 1995;26(11):2135-44.
- Südhof TC, Lottspeich F, Greengard P, Mehl E, Jahn R. A synaptic vesicle protein with a novel cytoplasmic domain and four transmembrane regions. *Science*. 1987;238(4830):1142-4.
- Südhof TC. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*. 1995;375(6533):645-53.

- Sugahara K, Mikami T, Uyama T, Mizuguchi S, Nomura K, Kitagawa H. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struct Biol.* 2003;13(5):612-20.
- Sugahara K, Mikami T. Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. *Curr Opin Struct Biol.* 2007;17(5):536-45.
- Susarla BT, Laing ED, Yu P, Katagiri Y, Geller HM, Symes AJ. Smad proteins differentially regulate transforming growth factor- β -mediated induction of chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurochem.* 2011;119(4):868-78.
- Szele FG, Alexander C, Chesselet MF. Expression of molecules associated with neuronal plasticity in the striatum after aspiration and thermocoagulatory lesions of the cerebral cortex in adult rats. *J Neurosci.* 1995;15(6):4429-48.
- Takamiya Y, Kohsaka S, Toya S, Otani M, Tsukada Y. Immunohistochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expression of cytoskeletal proteins following brain injury in rats. *Brain Res.* 1988;466(2):201-10.
- Tallaksen CM, Taubøll E. Excitatory effect of thiamin on CA1 pyramidal neurones in rat hippocampal slices in vitro. *Eur J Neurol.* 2000;7(6):693-8.
- Tam RC, Lau JY, Hong Z. Mechanisms of action of ribavirin in antiviral therapies. *Antivir Chem Chemother.* 2001;12(5):261-72.
- Tanaka C, Cooper JR. The fluorescent microscopic localization of thiamine in nervous tissue. *J Histochem Cytochem.* 1968;16(5):362-5.
- Tang X, Davies JE, Davies SJ. Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue. *J Neurosci Res.* 2003;71(3):427-44.
- Tarsa L, Goda Y. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(2):1012-6.
- Thon N, Haas CA, Rauch U, Merten T, Fässler R, Frotscher M, Deller T. The chondroitin sulphate proteoglycan brevican is upregulated by astrocytes after entorhinal cortex lesions in adult rats. *Eur J Neurosci.* 2000;12(7):2547-58.
- Tom VJ, Steinmetz MP, Miller JH, Doller CM, Silver J. Studies on the development and behavior of the dystrophic growth cone, the hallmark of regeneration failure, in an in vitro model of the glial scar and after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2004;24(29):6531-9.
- Tower DB, Young OM. The activities of butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase, the rate of anaerobic glycolysis, and the question of a constant density of glial cells in cerebral cortices of various mammalian species from mouse to whale. *J Neurochem.* 1973;20(2):269-78.
- Ujike H, Takaki M, Kodama M, Kuroda S. Gene expression related to synaptogenesis, neuritegenesis, and MAP kinase in behavioral sensitization to psychostimulants. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;965:55-67.
- Vallée S, Fouchier F, Braguer D, Marvaldi J, Champion S. Ribavirin-induced resistance to heat shock, inhibition of the Ras-Raf-1 pathway and arrest in G(1). *Eur J Pharmacol.* 2000;404(1-2):49-62.
- Verhaagen J, Oestreicher AB, Gispen WH, Margolis FL. The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *J Neurosci.* 1989;9(2):683-91.
- Viapiano MS, Matthews RT, Hockfield S. A novel membrane-associated glycovariant of BEHAB/brevican is up-regulated during rat brain development and in a rat model of invasive glioma. *J Biol Chem.* 2003;278(35):33239-47.
- Vink R, Nimmo AJ. Multifunctional drugs for head injury. *Neurotherapeutics.* 2009;6(1):28-42.

- Vink R, Van Den Heuvel C. Recent advances in the development of multifactorial therapies for the treatment of traumatic brain injury. *Expert Opin Investig Drugs*. 2004;13(10):1263-74.
- Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*. 2002;54(3):375-429.
- Vitković L, Steisslinger HW, Aloyo VJ, Mersel M. The 43-kDa neuronal growth-associated protein (GAP-43) is present in plasma membranes of rat astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(21):8296-300.
- Voskuhl RR, Peterson RS, Song B, Ao Y, Morales LB, Tiwari-Woodruff S, Sofroniew MV. Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J Neurosci*. 2009;29(37):11511-22.
- Walz W. pH shifts evoked by neuronal stimulation in slices of rat hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol*. 1989;67(6):577-81.
- Wang H, Katagiri Y, McCann TE, Unsworth E, Goldsmith P, Yu ZX, Tan F, Santiago L, Mills EM, Wang Y, Symes AJ, Geller HM. Chondroitin-4-sulfation negatively regulates axonal guidance and growth. *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 18):3083-91.
- Watanabe T, Kaji R, Oka N, Bara W, Kimura J. Ultra-high dose methylcobalamin promotes nerve regeneration in experimental acrylamide neuropathy. *J Neurol Sci*. 1994;122(2):140-3.
- Weber G, Nakamura H, Natsumeda Y, Szekeres T, Nagai M. Regulation of GTP biosynthesis. *Adv Enzyme Regul*. 1992;32:57-69.
- Weber G, Shen F, Orbán TI, Kökeny S, Olah E. Targeting signal transduction. *Adv Enzyme Regul*. 2003;43:47-56.
- Weber GA, Sloan P, Davies D. Nutritionally induced peripheral neuropathies. *Clin Podiatr Med Surg*. 1990;7(1):107-28.
- Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*. 2007;99(1):4-9.
- Wiche G. High-Mr microtubule-associated proteins: properties and functions. *Biochem J*. 1989;259(1):1-12.
- Wiedenmann B, Franke WW. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*. 1985;41(3):1017-28.
- Wilhelmsson U, Li L, Pekna M, Berthold CH, Blom S, Eliasson C, Renner O, Bushong E, Ellisman M, Morgan TE, Pekny M. Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *J Neurosci*. 2004;24(21):5016-21.
- Wilson MA, Gaze RM, Goodbrand IA, Taylor JS. Regeneration in the *Xenopus* tadpole optic nerve is preceded by a massive macrophage/microglial response. *Anat Embryol (Berl)*. 1992;186(1):75-89.
- Witkowski JT, Robins RK, Sidwell RW, Simon LN. Design, synthesis, and broad spectrum antiviral activity of 1-*D*-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide and related nucleosides. *J Med Chem*. 1972;15(11):1150-4.
- Witt ED. Neuroanatomical consequences of thiamine deficiency: a comparative analysis. *Alcohol Alcohol*. 1985;20(2):201-21.
- Wu D, Miyamoto O, Shibuya S, Mori S, Norimatsu H, Janjua NA, Itano T. Co-expression of radial glial marker in macrophages/microglia in rat spinal cord contusion injury model. *Brain Res*. 2005;1051(1-2):183-8.
- Wu VW, Schwartz JP. Cell culture models for reactive gliosis: new perspectives. *J Neurosci Res*. 1998;51(6):675-81.
- Wu YP, Siao CJ, Lu W, Sung TC, Frohman MA, Milev P, Bugge TH, Degen JL, Levine JM, Margolis RU, Tsirka SE. The tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin extracellular

- proteolytic system regulates seizure-induced hippocampal mossy fiber outgrowth through a proteoglycan substrate. *J Cell Biol.* 2000;148(6):1295-304.
- Xerri C. Post-lesional plasticity of somatosensory cortex maps: a review. *C R Acad Sci III.* 1998;321(2-3):135-51.
- Yamada H, Fredette B, Shitara K, Hagihara K, Miura R, Ranscht B, Stallcup WB, Yamaguchi Y. The brain chondroitin sulfate proteoglycan brevican associates with astrocytes ensheathing cerebellar glomeruli and inhibits neurite outgrowth from granule neurons. *J Neurosci.* 1997;17(20):7784-95.
- Yamada H, Watanabe K, Shimonaka M, Yamaguchi Y. Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family. *J Biol Chem.* 1994;269(13):10119-26.
- Yamada Y, Natsumeda Y, Weber G. Action of the active metabolites of tiazofurin and ribavirin on purified IMP dehydrogenase. *Biochemistry.* 1988;27(6):2193-6.
- Yamaguchi Y. Brevican: a major proteoglycan in adult brain. *Perspect Dev Neurobiol.* 1996;3(4):307-17.
- Yamaguchi Y. Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(2):276-89.
- Yamamoto T, Kuniki K, Takekuma Y, Hirano T, Iseki K, Sugawara M. Ribavirin uptake by cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells and *Xenopus laevis* oocytes expressing recombinant plasma membrane human nucleoside transporters. *Eur J Pharmacol.* 2007;557(1):1-8.
- Yamashita M, Yamamoto T. Wernicke encephalopathy with symmetric pericentral involvement: MR findings. *J Comput Assist Tomogr.* 1995;19(2):306-8.
- Yamatsu K, Kaneko T, Kitahara A, Ohkawa I. [Pharmacological studies on degeneration and regeneration of peripheral nerves. (1) Effects of methylcobalamin and cobamide on EMG patterns and loss of muscle weight in rats with crushed sciatic nerve]. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 1976;72(2):259-68.
- Yang J, Klaidman LK, Chang ML, Kem S, Sugawara T, Chan P, Adams JD. Nicotinamide therapy protects against both necrosis and apoptosis in a stroke model. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002;73(4):901-10.
- Yang SD, Song JS, Liu HW, Chan WH. Cyclic modulation of cross-linking interactions of microtubule-associated protein-2 with actin and microtubules by protein kinase FA. *J Protein Chem.* 1993;12(4):393-402.
- Yen SH, Fields KL. Antibodies to neurofilament, glial filament, and fibroblast intermediate filament proteins bind to different cell types of the nervous system. *J Cell Biol.* 1981;88(1):115-26.
- Yoshioka N, Asou H, Hisanaga S, Kawano H. The astrocytic lineage marker calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1 (Camsap1): phenotypic heterogeneity of newly born Camsap1-expressing cells in injured mouse brain. *J Comp Neurol.* 2012;520(6):1301-17.
- Young W. The post-injury responses in trauma and ischemia: secondary injury or protective mechanisms? *Cent Nerv Syst Trauma.* 1987;4(1):27-51.
- Yu ML, Dai CY, Chen SC, Lee LP, Huang JF, Lin ZY, Hsieh MY, Wang LY, ChuangWL, Chang WY. A prospective study on treatment of chronic hepatitis C with tailored and extended interferon-alpha regimens according to pretreatment virological factors. *Antiviral Res.* 2004;63(1):25-32.
- Yuan A, Rao MV, Sasaki T, Chen Y, Kumar A, Veeranna, Liem RK, Eyer J, Peterson AC, Julien JP, Nixon RA. Alpha-internexin is structurally and functionally associated with the neurofilament triplet proteins in the mature CNS. *J Neurosci.* 2006;26(39):10006-19.

- Yuan Q, Hu B, Su H, So KF, Lin Z, Wu W. GAP-43 expression correlates with spinal motoneuron regeneration following root avulsion. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj.* 2009; 4:18.
- Yuan W, Matthews RT, Sandy JD, Gottschall PE. Association between protease-specific proteolytic cleavage of brevican and synaptic loss in the dentate gyrus of kainate-treated rats. *Neuroscience.* 2002;114(4):1091-101.
- Zhang F, Inserra M, Richards L, Terris DJ, Lineaweaver WC. Quantification of nerve tension after nerve repair: correlations with nerve defects and nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg.* 2001;17(6):445-51.
- Zhou J, Wang H, Feng Y, Chen J. Increased expression of cdk5/p25 in N2a cells leads to hyperphosphorylation and impaired axonal transport of neurofilament proteins. *Life Sci.* 2010;86(13-14):532-7.
- Zietlow R, Dunnett SB, Fawcett JW. The effect of microglia on embryonic dopaminergic neuronal survival in vitro: diffusible signals from neurons and glia change microglia from neurotoxic to neuroprotective. *Eur J Neurosci.* 1999;11(5):1657-67.
- Zimmermann DR, Ruoslahti E. Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *EMBO J.* 1989;8(10):2975-81.
- Zörner B, Schwab ME. Anti-Nogo on the go: from animal models to a clinical trial. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1198 Suppl 1:E22-34.

Biografski podaci

Sanja Dacić (rođena Šubašić) je rođena 15.05.1973. godine u Splitu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1991. godine, a završila 2000. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija sa opštim uspehom 9,37 u toku studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Juna 2001. godine izabrana je za asistenta pripravnika na Katedri za opštu fiziologiju i biofiziku, Instituta za fiziologiju i biohemiju, Biološkog fakulteta Univerzita u Beogradu, za predmete Opšta fiziologija i biofizika i Neurobiologija. Iste godine je upisala poslediplomske studije na Biološkom fakultetu, smer Neurofiziologija. Magistarsku tezu pod naslovom "Uticaj ribavirina na proces reaktivne astroglioze nakon povrede mozga adultnih pacova", odbranila je 21.12.2004.godine, a u junu 2005. je izabrana u zvanje asistenta.

Naučno-istraživački rad mr Sanje Dacić realizovan je kroz projekte finansirane od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. U periodu 2001 – 2005. godine učestvovala je u realizaciji projekta "Neurohemijski i neurofiziološki mehanizmi oštećenja i oporavka centralnog nervnog sistema" (projekat 1647, rukovodilac prof. dr Mirjana Stojiljković), a u periodu od 2006. do 2010. u realizaciji projekta "Interakcija glijne i neurona u procesu oporavka nakon oštećenja centralnog nervnog sistema" (projekat 143005, rukovodilac prof. dr Mirjana Stojiljković). Od 2011. godine mr Sanja Dacić je učesnik projekta "Ćelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju" (projekat III410014) kojim rukovodi prof. dr Mirjana Stojiljković. U okviru ovog projekta je i istraživački zadatak koji se odnosi na izradu njene doktorke teze pod mentorstvom dr Sanje Peković i prof. dr Nadežde Nedeljković.

Koautor je 14 radova u međunarodnim vodećim časopisima, kao i brojnih domaćih i međunarodnih saopštenja.

Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Потписани-а Сања Дацић
број индекса /

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај Б витаминских комплекса и рибавирина на одговор нервних и
глијских ћелија и опоравак моторних функција након повреде мозга
пацова

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

Потпис докторанда

У Београду, 04.07.2013.

Сања Дацић

Прилог 2.

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА

Име и презиме аутора Сања Дацић

Број индекса _____/_____

Студијски програм _____/_____

Наслов рада Утицај Б витаминских комплекса и рибавирина на одговор нервних и глијских ћелија и опоравак моторних функција након повреде мозга пацова

Ментор др Сања Пековић и др Надежда Недељковић

Потписани/а Сања Дацић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 04.07.2013.

Sanja Dacic

Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

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

Утицај Б витаминских комплекса и рибавирина на одговор нервних и глијских ћелија и опоравак моторних функција након повреде мозга пацова

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____ 04.07.2013. _____

Sanya Decić

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство - некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално - без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство - без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.