

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marina M. Zarić

**Efekat kratkotrajne moždane  
ishemije/reperfuzije i tretmana  
dehidroepiandrosteronom na  
komponente signalnog puta NMDA  
receptora u hipokampusu i prečenoj  
kori pacova**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2019.

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marina M. Zarić

**Efekat kratkotrajne moždane  
ishemije/reperfuzije i tretmana  
dehidroepiandrosteronom na  
komponente signalnog puta NMDA  
receptora u hipokampusu i prečenoj  
kori pacova**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Marina M. Zarić

**Effects of brief cerebral  
ischemia/reperfusion and  
dehydroepiandrosterone treatment on  
components of NMDA receptor-  
mediated signalling in rat hippocampus  
and prefrontal cortex**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2019.

## MENTORI I ČLAN KOMISIJE

### **Mentori:**

Dr Jelena Martinović, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu- Institut za nuklearne nauke VINČA

Dr Nadežda Nedeljković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu- Biološki fakultet

### **Član komisije:**

Dr Dunja Drakulić, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu- Institut za nuklearne nauke VINČA

Datum odbrane:

## ZAHVALNICA

*Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke VINČA u okviru projekta finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: „Molekularni mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama CNS-a i perifernog tkiva kod sisara“ (OI 173044).*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki dr Jeleni Martinović na prenetom znanju, uloženom trudu i vremenu, korisnim savetima i sugestijama, izrazito velikom strpljenju i celokupnoj pomoći. Najveće hvala na prijateljstvu, toploj reči i beskonačno mnogo smeha i radosti koje je unela u moj život tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*Veliko hvala prof. dr Nadeždi Nedeljković na svakom neverovatnom predavanju, prenetom znanju tokom studija i korisnim sugestijama, pomoći, vremenu i trudu koje je uložila tokom čitanja ove doktorske disertacije, kao i na ukazanom poverenju.*

*Posebno hvala dr Dunji Drakulić na izdvojenom vremenu, trudu i pomoći tokom izvođenja hirurških zahvata i korisnim savetima i sugestijama kako tokom izrade tako i tokom čitanja doktorske disertacije.*

*Veliko hvala mojim dragim koleginicama dr Ivani Grković, dr Nataši Mitrović, Ivani Guševac Stojanović i kolegi Miloradu Dragiću na nesebičnoj pomoći, savetima i zanimljivim diskusijama. Hvala vam za svaki manje glupi ponedeljak, svaki osmeh i prijateljstvo...i hvala što posao pored vas nikada nije obaveza već zadovoljstvo.*

*Hvala svim kolegama Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke VINČA koji su na bilo koji način pomogli u izradi ove disertacije.*

*Hvala predivnim prijateljima koji svaki dan boje moj život u najlepše i najvedrije tonove. Hvala što ste uvek tu, vi ste moj svet.*

*Najveće hvala voljenoj porodici, pre svega bratu Marku i ocu Milanu koji su napravili od mene čoveka kakav sam danas.*

*Posebno hvala članovima porodice koji nisu više sa nama, pre svega mami Milici...ti si naš ponos i zvezda vodilja...*

## **Efekat kratkotrajne moždane ishemije/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom na komponente signalnog puta NMDA receptora u hipokampusu i prečenoj kori pacova**

### **SAŽETAK**

Stanje moždane ishemije/reperfuzije (I/R) karakteristično je za cerebrovaskularna oboljenja kao što su moždani udar i tranzitorni ishemijski atak (TIA). Promena signalizacije posredovana N-metil-D-aspartat (NMDA) receptorom ima značajnu ulogu u I/R-uzrokovanom oštećenju, dok je dehidroepiandrosteron (DHEA), pozitivni alosterični modulator NMDA receptora, najčešće okarakterisan kao neuroprotektivan u tretmanu ishemičnih stanja.

U ovoj disertaciji ispitivana je proteinska ekspresija komponenti kompleksa NMDA receptora i njegove nishodne signalizacije u hipokampusu i prečenoj kori mužjaka pacova Wistar soja 24 sata nakon podvezivanja obe zajedničke karotidne arterije u trajanju od 15 min i/ili efekat tretmana DHEA primenjenog 4 sata od hirurške procedure. Praćenje senzo-motorne funkcije i prisustvo infarktnih lezija na presecima celog mozga korišćeno je za validaciju I/R modela za proučavanje blažih ishemičnih stanja poput TIA. Takođe, izvršeno je ispitivanje efekata I/R i tretmana na histo/morfološkom nivou.

Odsustvo senzo-motornih deficita i infarktnih lezija kao i očuvana struktura tkiva i morfologija neurona u hipokampusu i prečenoj kori nakon I/R ukazuju na potencijalnu primenu modela u ispitivanju umerenih ishemičnih stanja. Region-specifične promene signalnog puta NMDA receptor/neuralna azot oksid sintaza/ azot oksid nakon kratkotrajne I/R govore u prilog većoj osetljivosti hipokampusa u odnosu na prečenu koru. Efekat DHEA uočen je isključivo nakon I/R, vraćajući u prečenoj kori parametare na kontrolnu vrednost, dok u hipokampusu promene Bax/Bcl-2 odnosa i potencijala mitohondrijske membrane ukazuju na pokretanje pro-apoptotskih

dešavanja. Stoga, prethodno okarakterisani neuroprotektivni efekat DHEA treba dodatno istražiti.

**Ključne reči:** moždana ishemija/reperfuzija, blaga ishemična stanja, tranzitorni ishemijski atak, dehidroepiandrosteron, NMDA receptor, hipokampus, prečeaona kora, pacov.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Neurobiologija

# **Effects of brief cerebral ischemia/reperfusion and dehydroepiandrosterone treatment on components of NMDA receptor-mediated signalling in rat hippocampus and prefrontal cortex**

## **ABSTRACT**

Cerebral ischemia/reperfusion (I/R) is characteristic of cerebro-vascular diseases such as stroke and transient ischemic attack (TIA). Alterations of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated signalling pathway are well recognized features of I/R-governed damage, while dehydroepiandrosterone (DHEA), its positive allosteric modulator, has been previously described as neuroprotective and potentially promising for therapy of ischemic conditions.

In this doctoral dissertation changes of components of the NMDA receptor complex and downstream signalling in hippocampus and prefrontal cortex were examined in male Wistar rats 24 h following 15 min bilateral common carotid artery occlusion. In addition, effects of 4 h post-surgical DHEA treatment were investigated. Sensory-motor function and presence of infarct lesions were used to validate suitability of I/R model for studying mild ischemic conditions such as TIA. Additionally, effects of I/R and treatment were evaluated on histo/morphological level.

Absence of sensory-motor deficits and infarct lesions, as well as preserved tissue structure and overall neuronal morphology in hippocampus and prefrontal cortex following I/R and treatment were detected indicating suitability of used I/R model for investigation of mild ischemic states. Region-specific postischemic changes of NMDA receptor/neuronal nitric oxide synthase/nitric oxide following short-term I/R indicate higher sensitivity of hippocampus compared to prefrontal cortex. DHEA effect was detected exclusively following I/R, returning the parameters in prefrontal cortex to the control value, while hippocampal Bax/Bcl-2 ratio and mitochondrial membrane potential changes indicate the initiation of pro-apoptotic events. Therefore,



previously reported neuroprotective effect of DHEA should be considered with caution and further investigated.

**Key words:** cerebral ischemia/reperfusion, mild ischemic conditions, transient ischemic attack, dehydroepiandrosterone, NMDA receptor, hippocampus, prefrontal cortex, rat

**Research area:** Biology

**Research field:** Neurobiology

## SKRAĆENICE

$\Delta\Psi$ m- potencijal mitohondrijske mebrane

AMPA receptori- receptori osetljivi na  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4 izoksazolpropionsku kiselinu

AOE- antioksidativni enzimi

ATD- amino-terminalni domen

ATP- adenzin trifosfat

Bax- engl. Bcl-2-associated protein X

Bcl-2- engl. B-cell lymphoma 2

BSA- albumin goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*)

CA1-4- Amonov rog 1-4 (lat. *cornu ammonis 1-4*)

COX-2- ciklooksigenaza-2

CTD- karboski-terminalni domen

DHEA- dehidroepiandrosteron

DHEAS- dehidroepiandrosteron-sulfat

DTNB- 5,5-ditio-bis-nitrobenzoeva kiselina

eNOS- endotelna azot oksid sintaza (engl. *endothelial nitric oxide synthase*)

GABA<sub>A</sub>R- receptor za  $\gamma$ -aminobuternu kiselinu tipa A

GPx- glutation peroksidaza

GR- glutation reduktaza

GSH- redukovani glutation

GSSG- oksidovani glutation

GST- glutation S-transferaza

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- vodonik peroksid

HMU- hemoragijski moždani udar

HNE- hidroksinonenal

I/R- ishemija/reperfuzija

IMU- ishemijski moždani udar

iNOS- inducibilna azot oksid sintaza (engl. *inducible nitric oxide synthase*)

KMB- krvno-moždana barijera

LVD- ligand- vezujući domen

MCAO- okluzija srednje moždane arterije (engl. *middle cerebral artery occlusion*)

MD- transmembranski domen

MDA-malondialdehid

MM- mitohondrijska membrana

MU- moždani udar

N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- azot (III)-oksid

NeuN- engl. neuronal nuclear protein

NMDA receptori- receptori osetljivi na N-metil-D-aspartatsku kiselinu (engl. *N-methyl-D-aspartate receptors*)

nNOS- neuralna azot oksid sintaza (engl. *neuronal nitric oxide synthase*)

NO- azot oksid

NO<sub>2</sub>- azot (IV)-oksid

OG- optička gustina

ONOO- peroksinitrit

PFA- paraformaldehid

PSD-95- engl. postsynaptic density protein-95

RH 123- rodamin 123

RNS- reaktivne vrste azota (engl. *reactive nitrogen species*)

ROO- peroksil radikal

ROS- reaktivne vrste kiseonika (engl. *reactive oxygen species*)

TBA- tiobarbiturna kiselina (engl. *thiobarbituric acid*)

TIA- tranzitorni ishemijski atak

TTC- trifeniltetrazolijum- hlorid

$\sigma$ 1R- sigma-1 receptor

# Sadržaj

<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
Moždana cirkulacija; moždana ishemija/reperfuzija .....	2
Moždani udar i tranzitorni ishemijski atak.....	4
Životinjski modeli moždane ishemije/ (reperfuzije) .....	6
Fokalna moždana ishemija/(reperfuzija) i životinjski modeli .....	6
Potpuna/nepotpuna globalna ishemija/ (reperfuzija) i životinjski modeli.....	7
Selektivna osetljivost moždanih struktura na ishemiju/reperfuziju.....	9
Signalni put NMDA receptorskog kompleksa u ishemiji/reperfuziji.....	11
NR2B/PSD95/neuralna azot oksid sintaza signalni kompleks .....	13
Uloga NO u molekulskim promenama koje karakterišu moždanu ishemiju/reperfuziju .....	15
Reaktivne oksidativne vrste kao uzrok oštećenja tokom i nakon moždane ishemije/reperfuzije .....	17
Promene povezane sa lipidnom peroksidacijom i odnosom redukovani/oksidovani glutation tokom moždane ishemije/reperfuzije.....	20
Pro-apoptotska signalizacija u ćeliji.....	21
Unutrašnji put apoptoze i uloga proteina Bcl-2 porodice.....	21
Potencijal mitohondrijske membrane .....	24
Dehidroepiandrosteron .....	26
Mehanizam delovanja dehidroepiandrosterona.....	26
Neurobiološki efekti dehidroepiandrosterona .....	28
Dehidroepiandrosteron i moždana ishemija/reperfuzija.....	30
<b>CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>31</b>
<b>MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>33</b>
Etičke smernice i postupak sa eksperimentalnim životinjama .....	34
Hirurška procedura .....	34
Eksperimentalne grupe i tretman.....	35
Procena senzo-motorne funkcije životinja.....	37
Procena prisustva infarktne lezije bojenjem trifeniltetrazolijum-hloridom.....	37
Priprema tkiva za histološku i imunohistohemijsku analizu.....	38
Bojenje Fluro-Jade C bojom.....	38

Bojenje toluidin plavim .....	38
Bojenje hematoksilin-eozinom.....	39
Imunohistohemijska analiza NeuN proteina.....	39
Priprema homogenata celog tkiva, citosolne/ mitohondrijske frakcije i intaktnih mitohondrija .....	40
Izolacija frakcije prečišćenih sinaptozoma .....	41
Biohemijske analize .....	43
Određivanje koncentracije proteina.....	43
Merenje nivoa malondialdehida u homogenatu celog tkiva hipokampusa i prečeeone kore .....	44
Merenje nivoa metabolita azot oksida (NOx-) u citosolnoj frakciji hipokampusa i prečeeone kore .....	44
Određivanje nivoa redukovanoog glutationa u citosolnoj frakciji hipokampusa i prečeeone kore .....	45
Western blot analiza proteina u hipokampusu i prečeeonoj kori.....	45
Merenje potencijala mitohondrijske membrane u hipokampusu i prečeeonoj kori	50
Statistička obrada rezultata .....	50
<b>REZULTATI.....</b>	<b>51</b>
Kratkotrajna ishemija/ reperfuzija i tretman dehidroepiandrosteronom ne dovode do pojave senzo-motornih deficita .....	52
Određivanje prisustva infarktne lezije nakon ishemije/ reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom.....	53
Kratkotrajna ishemija/ reperfuzija i tretman dehidroepiandrosteronom ne dovode do neurodegenerativnih promena u hipokampusu i prečeeonoj kori.....	54
Procena morfologije neurona u hipokampusu i prečeeonoj kori nakon kratkotrajne ishemije/ reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom.....	55
Efekat kratkotrajne ishemije/ reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom na nivo malondialdehida u homogenatu hipokampusa i prečeeone kore.....	58
Efekat kratkotrajne ishemije/ reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom na nivo redukovanoog glutationa u frakciji citosola hipokampusa i prečeeone kore.....	59
Efekat ishemije/ reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom na nivo proteina vGlut1 i komponente sinaptičkog kompleksa NMDA receptora .....	60
Promene nivoa proteina vGluT1.....	60
Promene proteinskog nivoa subjedinica kompleksa NMDA receptora.....	61
Promene nivoa proteina PSD-95.....	64

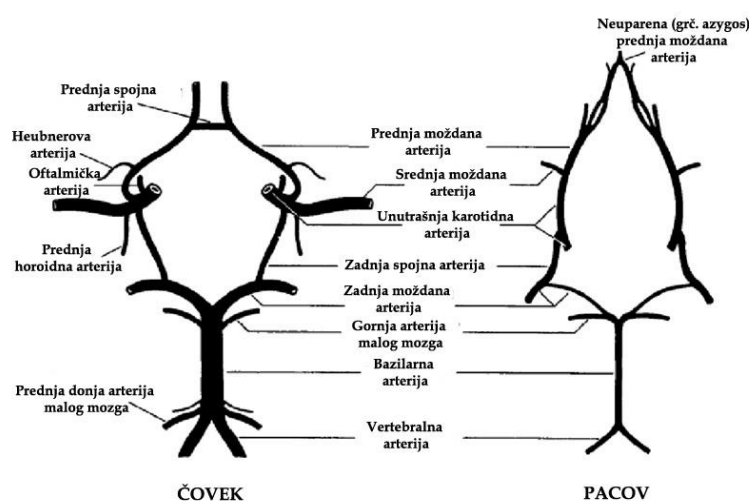
Efekat ishemije/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom na nivo proteina nNOS i NO u frakciji citosola hipokampusa i prečone kore .....	65
Efekat kratkotrajne ishemije/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom na nivo proteina Bax i Bcl-2 u citosolnoj i mitohondrijskoj frakciji hipokampusa i prečone kore.....	67
Efekat kratkotrajne ishemije/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom na potencijal membrane mitohondrija u ćelijama hipokampusa i prečone kore .....	69
<b>DISKUSIJA .....</b>	<b>70</b>
Opravdanost korišćenog I/R modela za proučavanje promena koje karakterišu tranzitorni ishemijski atak.....	71
Histološka i imunohistohemijska analiza nakon kratkotrajne ishemije/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom- relevantnost dobijenih podataka u proceni patofiziologije tranzitornog ishemijskog ataka .....	73
Odsustvo promena nivoa malondialdehida i redukovano glutaciona nakon ishemije/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom.....	74
Promene nivoa proteina vGluT1 i komponenti kompleksa NMDA receptora nakon kratkotrajne ishemije/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom .....	75
Promene nNOS i NO nakon kratkotrajne ishemije/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom.....	79
Region-specifične promene pro-apoptotske signalizacije u ishemičnoj grupi tretiranoj dehidroepiandrosteronom.....	81
<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>84</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>87</b>
<b>PRILOZI .....</b>	<b>113</b>
Biografija autora.....	114
Izjava o autorstvu.....	115
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorског рада.....	116
Izjava o korišćenju .....	117

# UVOD



## Moždana cirkulacija; moždana ishemija/reperfuzija

Kod pacova, kao i kod čoveka, mozak se snadbeva krvlju putem zajedničkih karotidnih arterija (lat. *arteria carotis communis*) i vertebralnih arterija (lat. *arteria vertebralis*). Ove arterije zajedno sa prednjim (lat. *arteria communicans anterior*) i zadnjim spojnim arterijama (lat. *arteria communicans posterior*) u bazi lobanje formiraju kružnu formaciju pod imenom Vilisov krug. Vertebralne arterije se pre ulaska u Vilisov krug spajaju u bazilarnu arteriju (lat. *arteria basilaris*) koja poseduje brojne kolaterale, pontinske arterije (lat. *arteriae ad pontem*). Od ove strukture polaze prednja moždana arterija (lat. *arteria cerebri anterior*), srednja moždana arterija (lat. *arteria cerebri media*), zadnja moždana arterija (lat. *arteria cerebri posterior*), kao i gornja arterija malog mozga (lat. *arteria cerebelli superior*). Prednje i donje arterije malog mozga (lat. *arteria cerebelli anterior/inferior*) polaze od Vilisovog kruga i nastaju grananjem vertebralnih arterija (Mamo, 2015; Lee, 1995). Uzimajući u obzir anatomiju i organizaciju arterijskog sistema, smanjen protok krvi prouzrokovan okluzijom nekog od pomenutih krvnih sudova može biti kompenzovan u određenoj meri. Arterijski sistem mozga čoveka i pacova, kao i njihove razlike šematski su prikazani na Slici 1.



Slika 1. Šematski prikaz moždanih arterija čoveka i pacova. Preuzeto od Mamo, 2015 i potom modifikovano.

Moždana ishemija/reperfuzija (I/R) nastaje usled smanjenja protoka krvi kroz mozak i njegovog ponovnog uspostavljanja. Uzroci nastanka I/R su mnogobrojni, a najčešće podrazumevaju začepljenje krvnog suda trombom ili embolusom ili suženje istog (lat. *stenosis*). I/R se može javiti i kao posledica srčanog zastoja ili nepravilnosti rada srca, poremećaja disanja, nakon upotrebe određenih medikamenata i zloupotrebe narkotika, hirurških intervencija, ali i kao sekundarna komplikacija drugih oboljenja (Covickovic- Sternic i sar, 2012).

Prilikom smanjenja moždane cirkulacije dolazi do različitih ishemičnih promena u moždanom tkivu, koje mogu biti praćene smrću neurona ukoliko je prisutna izraženija redukcija protoka krvi odnosno duže trajanje ishemije (Harukuni i Bhardwaj, 2006). Faza ishemije nije jedini, a ni najvažniji faktor koji uzrokuje oštećenje moždanog tkiva. Iako uspostavljanje protoka krvi omogućava ponovno snabdevanje hranljivim materijama i kiseonikom koji su nepohodni za preživljavanje ćelija i oporavak tkiva, ono može dovesti i do „reperfuzione povrede“ koja značajno doprinosi oštećenju (White i sar., 2000; Sanderson i sar., 2013; L i sar., 2016). Kao posledica dva navedena procesa javljaju se patofiziološke promene u ćelijama kao što su:

- smanjena proizvodnja adenozin trifosfata (ATP) (White i sar., 2000);
- povećanje unutarćelijske koncentracije  $Ca^{2+}$  (Lai i sar., 2011; Wu i Tymianski, 2018);
- formiranje reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *reactive oxygen species*- ROS) i azota (engl. *reactive nitrogen species*- RNS), praćeno pojavom oksidativnog i nitrozativnog stresa (Candelario-Jalil i sar., 2001; Kalogeris i sar., 2012; Awooda i sar., 2015; Chen i sar., 2017b);
- zapaljenjski procesi (L i sar., 2016);
- modulacija sastava i funkcije receptora (Johansson i sar., 2012; Zhou i Sheng, 2013);
- neurotoksičnost posredovana glutamatom i dopaminom (White i sar., 2000; Wu i Tymianski, 2018);

- modulacija pro-/anti-apoptotskih proteina koja može pokrenuti apoptotsku signalnu kaskadu i narušiti funkciju mitohondrija (Chan, 2004; Kalogeris i sar., 2012; Russo i sar., 2018).

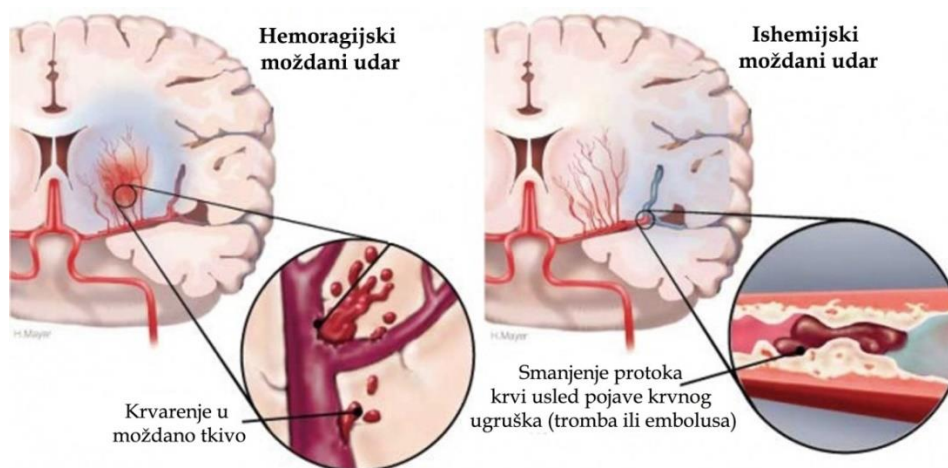
S obzirom na to da moždana I/R predstavlja karakteristiku cerebrovaskularnih oboljenja kao što su moždani udar (MU) i tranzitorni ishemijski atak (TIA), izučavanje I/R na životinjskim modelima značajno je za razumevanje njihove patogeneze i potencijalnih terapeutika.

### **Moždani udar i tranzitorni ishemijski atak**

Moždani udar osim visokog stepena mortaliteta, odgovoran je i za najveći stepen invaliditeta u odnosu na sve druge neurološke bolesti, te stoga predstavlja ne samo medicinski već i značajni socio-ekonomski problem. Na osnovu uzroka nastanka MU, moguće je izvršiti sledeću podelu na:

- ishemijski moždani udar (IMU) koji nastaje usled okluzije krvnog suda trombom ili embolusom i ima incidencu od 75- 80%;
- hemoragijski moždani udar (HMU), koji se može javiti u obliku unutar-moždanog ili krvarenja u likvorne prostore. HMU se javlja sa učestalošću od 20- 25% (Slika 2).

U zavisnosti od regiona koji je pogođen udarom, oba tipa MU karakterišu simptomi kao što su hemipareza, gubitak senzibiliteta, prostorni neglect, homonimna hemianopsija, poremećaj konjugovanog pogleda, ataksija, dizartrija, disfagija i drugi. Prvih 24 sata nakon MU ključno je za primenu odgovarajućih terapeutika i oporavak pacijenta (Covickovic- Sternic i sar, 2012).



Slika 2. Prikaz mehanizma nastanka HMU i IMU. Preuzeto sa:

<http://neurowiki2013.wikidot.com/individual:alzheimers-disease-and-stroke>.

TIA predstavlja kratku epizodu neurološke disfunkcije uzrokovane fokalnom ishemijom mozga, kičmene moždine ili retine, nakon koje se neurovizuelizacionim metodama ne detektuje prisustvo akutnog infarkta u mozgu (Easton i sar., 2009; Joseph i sar., 2018). Takođe, kod pacijenata sa okluzijom jedne ili obe zajedničke karotidne arterije može doći do pojave TIA (Schroeder i sar., 1986; Lai i sar., 2005; Kavakli i sar., 2015).

Uobičajeno simptomi traju do 15 min i podrazumevaju slabost ekstremiteta na jednoj strani tela, senzorne deficite, vizuelne i govorne smetnje, nestabilnost i poteškoće u hodu (Kim, 2014). Osim toga stanje može biti praćeno padom kognitivnih funkcija i/ili atrofijom mozga što može ukazati na potencijalno trajno oštećenje (Walters i sar., 2003; Li i sar., 2013).

U većini slučajeva TIA nastupa naglo, uglavnom bez provokacija i često prethodi IMU. TIA povećava rizik od nastanka novog napada ili niza istih. „Krešendo TIA“ je termin za dva ili više napada tokom 24 sata i ovakvo stanje zahteva hitnu hospitalizaciju i terapiju (Covickovic- Sternic i sar, 2012). Važno je naglasiti da pacijenti nakon TIA imaju povećan rizik od pojave MU, pogotovo u prvih 24 sata, stoga su neposredna procena i primena adekvatnih terapeutika izrazito značajni za oporavak i preživljavanje pacijenta (Coutts, 2017; Panuganti i Dulebohn, 2018).

## Životinjski modeli moždane ishemije/(reperfuzije)

U ispitivanjima koja se zasnivaju na životinjskim modelima ishemije mozga najčešće se koriste srođeni sojevi pacova, s obzirom na anatomske i fiziološku sličnost sa čovekom, veliku genetičku homogenost unutar određenog soja, laku eksperimentalnu manipulaciju i ekonomičnost u finansijskom pogledu (Sicard i Fisher, 2009).

Eksperimentalni dizajn koji podrazumeva opstrukciju krvnog suda/sudova bez ponovnog uspostavljanja moždane cirkulacije odlikuje hronična hipoperfuzija kod koje izostaje reperfuziona povreda. Ovaj tip ishemije je karakteristika prirodnog procesa starenja, ali može biti jedan od uzročnika neuropatoloških stanja, kao što su različiti tipovi demencija i Alchajmerova bolest. Ukoliko se nakon okluzije krvnog suda/sudova posle određenog vremenskog perioda dopusti uspostavljanje krvotoka dolazi do pojave reperfuzione povrede. Ovakvi I/R modeli koriste se za proučavanje stanja kao što su privremeni zastoj srca, MU, TIA i drugi (Bacigaluppi i sar., 2010). Stoga, u zavisnosti od cilja istraživanja, životinjski modeli ishemije mogu biti trajni (hronična hipoperfuzija određene razmere) ili privremeni („pravi“ I/R modeli).

## Fokalna moždana ishemija/(reperfuzija) i životinjski modeli

Fokalna moždana ishemija nastaje usled drastičnog smanjenja protoka krvi u određenom regionu mozga. Ovaj tip ishemije obično se javlja kao posledica začepjenja krvnih sudova mozga često izazivajući nastanak MU ili TIA.

U tkivu zahvaćenom fokalnom moždanom ishemijom uočavaju se dva regiona- ishemijsko jezgro i region oko njega označen kao *senka* (lat. *penumbra*). Jezgro je region direktno pogođen ishemijom i predstavlja centar oštećenja. Sa druge strane, region senke biva posredno zahvaćen ishemijom, te u njemu promene nisu tako drastične, kao u samom jezgru. U ovoj oblasti ćelije nemaju

sposobnost provođenja akcionog potencijala, ali su i dalje metabolički aktivne i vijabilne. One u narednim satima primaju štetne signale iz mrtvih ćelija jezgra i ukoliko pro-apoptotski signali preovladaju, ove ćelije nestaju za nekoliko dana programiranim tipom ćelijske smrti, kao što su apoptoza i autofagocitoza (Broughton i sar., 2009), što dodatno pogoršava oštećenje izazvano ishemijom kao i klinički ishod (Gauthier i sar., 2012; Puig i sar., 2018).

Najveći broj studija fokalne moždane ishemije izvodi se upotrebom modela okluzije srednje moždane arterije (engl. *middle cerebral artery occlusion-MCAO*) (Sicard i Fisher, 2009). Okluzija se može postići uvođenjem monofilamenta (Sicard i Fisher, 2009), elektrokauterizacijom ili fotohemijski primenom fotosenzitivne boje koja biva pobuđena laserom te oštećuje endotelne ćelije MCA i dovodi do agregacije trombocita i formiranja tromba (Sommer, 2017). Za ispitivanje potencijalnih trombolitičkih terapeutika koriste se životinjski modeli kod kojih se fokalna ishemija postiže ubacivanjem krvnog ugruška ili specifične supstance/mikrosfere direktno u krvni sud (Sommer, 2017). Još jedan od modela podrazumeva stereotaktički navođeno injeciranje endotelina-1 koji poseduje potentno vazokonstriktivno dejstvo te se na minimalno invazivni način postiže okluzija ciljanog krvnog suda (Sommer, 2017). Postavljanje hirurških mini-klipsi na željeni krvni sud može poslužiti kao još jedna od tehnika za kreiranje fokalne I/R.

## **Potpuna/nepotpuna globalna ishemija/(reperfuzija) i životinjski modeli**

Do stanja potpune globalne moždane ishemije kod ljudi dolazi prilikom potpunog zastoja u radu srca ili prilikom fizičkog stezanja vrata te stoga postoji mali broj modela koji simuliraju ovo stanje budući da su istraživanja koja se bave nepotpunom globalnom ishemijom od većeg kliničkog značaja.

Ranije su primenjivani modeli potpune globalne ishemije, kao što su dekapitacija (Lowry i sar., 1964) i mehaničko stezanje vrata (Siemkowicz i

Gjedde, 1980), ali se iz etičkih razloga danas ne upotrebljavaju. Ventrikularna fibrilacija predstavlja još jednu od tehnika kojom se uspešno uspostavlja stanje kompletne globalne ishemije karakteristične za zastoj u radu srca. Životinje koje se tom prilikom koriste su uglavnom veći sisari, dok se pacovi i miševi retko koriste (Traystman, 2003). Pulsinelli i Brierley 1979. godine razvili su takozvani 4-VO (engl. *four-vessel occlusion*) model koji podrazumeva okluziju leve i desne zajedničke karotidne arterije i obe vertebralne arterije (Pulsinelli i Buchan, 1988). Ovo je jedan od najkorišćenijih modela za izučavanja potpune globalne moždane ishemije.

Nakon 4-VO modela, osmišljen je 2-VO (engl. *two-vessel occlusion*) model u kome eksperimentalna životinja biva podvrgnuta okluziji obe zajedničke karotidne arterije dok vertebralne arterije ostaju netaknute, te se na njemu može proučavati nekompletna globalna ishemija (Eklof i Siesjo, 1972). Opstrukcija karotidnih arterija se može postići podvezivanjem (hirurškim koncem ili mini-klipsama) ili elektrokauterizacijom. Kod ljudi ovaj tip ishemije može se javiti usled začepljenja karotidnih arterija, MU i dr. Budući da kod pacijenata kod kojih postoji okluzija jedne ili obe zajedničke karotidne arterije može doći do pojave TIA (Schroeder i sar., 1986; Kavakli i sar., 2015; Lai i sar., 2005), modeli nepotpune globalne ishemije mogu biti od velikog značaja prilikom izučavanja mehanizama patogeneze TIA i dejstva potencijalnih terapeutika.

## Selektivna osetljivost moždanih struktura na ishemiju/reperfuziju

Hipokampus (lat. *hippocampus*) je smešten u središnjem slepoočnom režnju ispod moždane kore sa kojom je tesno povezan. Sastoji se od dva anatomske odvojena entiteta označena kao Amonov rog, sa sektorima 1-4 (lat. *cornu ammonis 1-4- CA1-4*) i zubata vijuga (lat. *gyrus dentatus*), koji sa entorinalnom korom (lat. *cortex entorhinalis*) čine hipokampusnu formaciju (lat. *formatio hippocampi*). Hipokampus igra bitnu ulogu u procesima učenja i formiranja memorije, radnoj, prostornoj i relacionoj memoriji, regulaciji visceralnih funkcija, uključujući regulaciju hipotalamo-hipofizno-nadbubežne (HHN) ose (Reznikov, 1991).

Prečeaona kora velikog mozga (lat. *cortex prefrontalalis*) kod ljudi se često označava kao „centar ličnosti“, s obzirom na to da je odgovorna za primanje visoko obrađenih informacija iz svih senzornih sistema i reagovanje, te je neophodna za postojanje osećaja savesti i crte ličnosti (Goldman-Rakic i sar., 1996). Ova struktura učestvuje u regulaciji ponašanja (Goldman-Rakic, 1996), obradi oprečnih ideja, pravljenju izbora i predviđanju ishoda određene radnje ili događaja, vršenju poređenja trenutnih događaja/ stanja sa onima u prošlosti i reakcija na iste (Hathaway i Newton, 2018). Prečeaona kora takođe reguliše i HHN osu. Lezije u prečeonoj kori mogu dovesti do narušavanja memorije, nemogućnosti obavljanja različitih kompleksnih zadataka, narušenog rasuđivanja, emocionalne nestabilnosti i poremećaja pažnje (Hathaway i Newton, 2018).

Postojanje jasno definisane prečeaone kore pacova odnosno njena anatomska organizacija i funkcionalna uloga bila je predmet mnogih naučnih debata, te još uvek postoje nesuglasice oko ovog pitanja (Seamans i sar., 2008; Kesner i Churchwell, 2011; Hathaway i Newton, 2018). U pogledu strukturne organizacije i kompatibilnosti sa primatima (i čovekom), trenutno prihvaćeno stanovište je da prečeaona kora pacova odgovara anteriornoj pojasnoj kori (lat.



*gyrus cingulatus*) i dorzolateralnoj prečeonoj kori primata (Seamans i sar., 2008). Sa funkcionalnog aspekta, prečeona kora pacova ima ulogu u formiranju radne memorije i unutrašnjem osećaju o protoku vremena, planiranju, fleksibilnosti i plastičnosti u ponašanju i donošenju odluka (Kesner i Churchwell, 2011).

Neuropatološke studije na životinjskim modelima pokazale su postojanje hijerarhije u pogledu osetljivosti moždanih struktura na I/R (Smith i sar., 1984). Hipokampus je označen kao najosetljivija struktura, dok su nova kora velikog mozga (lat. *neocortex*), kao i Purkinje ćelije malog mozga, nešto manje osetljivi od hipokampusa, ali su takođe izrazito podložne oštećenju (Cervos-Navarro i Diemer, 1991). Neophodno je naglasiti da nisu svi neuroni hipokampusa i moždane kore podjednako osetljivi na I/R. Neuroni CA1 regiona i hilusa (lat. *hillus*) zajedno sa piramidnim neuronima kore III i V sloja označavaju se kao selektivno osetljivi neuroni (engl. *selective vulnerable neurons*- SVNs). Dendriti SVNs uspostavljaju veliki broj sinapsi sa neuronima koji oslobađaju glutamat. Smatra se da je jedan od razloga povećane osetljivosti SVNs, upravo neurotoksičnost posredovana glutamatom, te da ona predstavlja jedan od najznačajnijih mehanizama oštećenja izazvanih delovanjem I/R (White i sar., 2000). Literaturni podaci ukazuju i na različiti odgovor ćelija na I/R. *In vitro* studije su pokazale da većina neurona umire 60 do 90 min nakon prestanka snabdevanja kiseonikom i glukozom, dok se kod astrocita ista oštećenja dešavaju 4 do 6 sati nakon zaustavljanja cirkulacije (Barreto i sar., 2011). Veća osetljivost neurona u odnosu na glijske ćelije uočena je i u životinjskim modelima I/R (Farkas i sar., 2007).

## Signalni put NMDA receptorskog kompleksa u ishemiji/reperfuziji

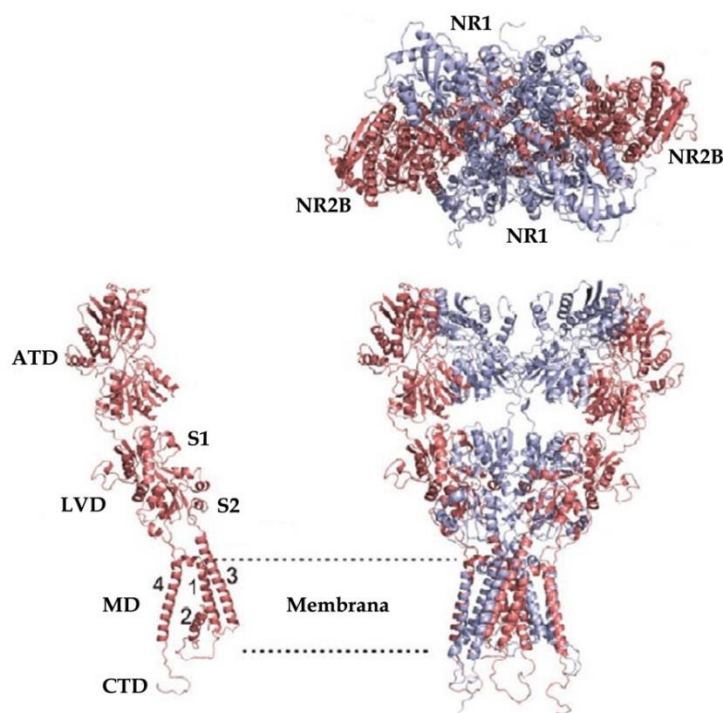
Ograničeni protok krvi tokom faze ishemije onemogućava snabdevanje neurona kiseonikom i hranljivim materijama dovodeći, između ostalog, do narušavanja jonske homeostaze (Dirnagl i sar., 1999). Poremećaj u jonskom gradijentu rezultuje depolarizacijom neurona usled čega dolazi do povećanog oslobađanja ekscitatornih neurotransmitera (prevashodno glutamata) u sinaptički prostor. Istovremeno, gubitak energije izazvan ishemijom narušava funkciju transportera za preuzimanje glutamata, te dolazi do preteranog nakupljanja glutamata u sinaptičkoj pukotini i prekomerne aktivacije glutamatnih receptora na postsinaptičkim neuronima (Wu i Tymianski, 2018). Do danas su okarakterisana tri tipa jonotropnih receptora za glutamat i imenovana prema nazivima sintetičkih agonista pomoću kojih su otkriveni:

- receptori osetljivi na N-metil-D-aspartatsku kiselinu (engl. *N-methyl-D-aspartate receptors*- NMDA receptori);
- receptori osetljivi na  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionsku kiselinu (engl.  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors*- AMPA receptori);
- receptori osetljivi na kainičnu kiselinu (engl. *kainic acid receptors*).

NMDA receptori predstavljaju podklasu jonotropnih glutamatnih receptora, koja je neophodna za održavanje niza neuroloških funkcija, uključujući sinaptičku plastičnost, formiranje memorijskih zapisa, pravilan razvoj mozga i preživljavanje neurona u fiziološkim uslovima. Narušena funkcija NMDA receptora može biti uzrokovana različitim faktorima, kao što su promena otvorenosti kanala, promene u ekspresiji subjedinica odnosno sastavu kompleksa NMDA receptora i njegove lokacije (sinaptički *vs.* ekstrasinaptički). Navedene promene mogu imati važnu ulogu u različitim neurološkim i psihijatrijskim poremećajima, obzirom na to da je hiperaktivnost ili

hipofunkcija NMDA receptora neretko pridružena etiologiji ovih bolesti (Zhou i Sheng, 2013).

Funkcionalni NMDA receptori su heterotetramerni kompleksi sačinjeni od dve konstitutivno ekspimirane NR1 i najmanje jedne subjedinice tipa NR2 (A-D) ili NR3 (A-B) (Ulbrich i Isacoff, 2008; Vyklicky i sar., 2014). Sve subjedinice imaju značajan nivo homologije i strukturno su jako slične, a njihova domenska organizacija je visoko konzervirana. Svaka od subjedinica poseduje vanćelijski amino-terminalni domen (ATD) i ligand-vezujućí domen (LVD), koji interaguje sa transmembranskim domenom (MD), koji formira poru kanala (Traynelis i sar., 2010). Transmembranski heliski MD povezani su sa unutarćelijskim karboski-terminalnim domenima (CTD) (Traynelis i sar., 2010) (Slika 3).



Slika 3. Prikaz trodimenzionalnog modela NR1/NR2 receptorskog kompleksa. Preuzeto od Vyklicky i sar., 2014 i potom modifikovano.

U stanju mirovanja, pore kanala NMDA receptora blokirane su jonima  $Mg^{2+}$ . Nakon oslobađanja glutamata iz presinapse dolazi do aktivacije AMPA receptora, što uzrokuje delimičnu depolarizaciju postsinaptičke membrane

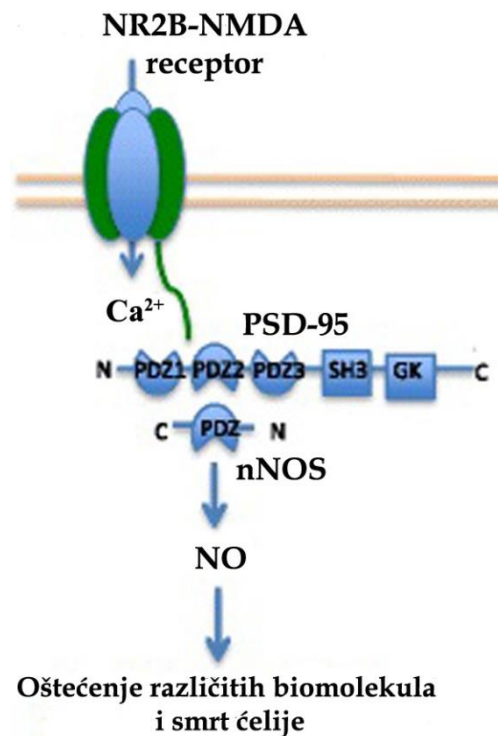
neophodnu za uklanjanje  $Mg^{2+}$  bloka sa pore kanala NMDA receptora. Pored ovoga, za aktivnost NMDA receptora, koji se sastoji od NR1/NR2 subjedinica, neophodno je istovremeno vezivanje agonista i koagonista, odnosno, dva molekula L-glutamata i dva molekula glicina (ređe D-serina). NMDA receptori sačinjeni od NR1/NR3 subjedinica mogu biti aktivirani i samo vezivanjem glicina (Pachernegg i sar., 2012). Nakon aktivacije NMDA receptora, joni  $Na^+$  i  $Ca^{2+}$  prolaze kroz kanal u ćeliju čime se postiže dalja depolarizacija membrane i pokreću se brojni signalni putevi.

NR2 subjedinica određuje elektrofiziološke i farmakološke osobine receptora i definiše prirodu signalne transdukcije posredovane NMDA receptorom. Karboksi-terminalni domeni NR2A i NR2B subjedinica predstavljaju metu vezivanja različitih proteina, i brojnih regulatornih fosforilacija, koje utiču na aktivnost i lokalizaciju receptora (Salter i Kalia, 2004; Zhou i Sheng, 2013). Iako NMDA receptori sačinjeni od NR2A i NR2B subjedinice poseduju neke zajedničke proteinske partnere, kao što je PSD-95 (engl. *postsynaptic density protein-95*) (Sheng i Kim, 2011), većina njih je različita. Shodno navedenom, NR2B subjedinica može funkcionisati kao mesto za pristajanje različitih proteina koji podstiču ćelijsku smrt, dok signalizacija posredovana NR2A subjedinicom može uticati pozitivno na preživljavanje ćelija i oporavak (Zhou i Sheng, 2013).

## **NR2B/PSD95/neuralna azot oksid sintaza signalni kompleks**

**NR2B/PSD-95/neuralna azot oksid sintaza** (engl. *neuronal nitric oxide synthase- nNOS*) signalni kompleks predstavlja jedan od najranije okarakterisanih kompleksa NR2B subjedinice i pridruženih proteina koji učestvuju u oštećenju i smrti neurona tokom I/R. PSD-95 je sinaptički protein koji ukotvljava i stabilizuje receptor u membrani i privlači različite signalne molekule u neposrednu blizinu unutarćelijske pore kanala NMDA receptora. nNOS katalizuje reakciju hidrosilacije L-arginina u prisustvu kiseonika tokom

koje nastaje azot oksid (NO) i u mozgu pacova eksprimira se prevashodno na neuronima, iako je njeno prisustvo potvrđeno i na drugim tipovima ćelija kao što su astrociti i srčane mišićne ćelije (Zhou i Zhu, 2009).



Slika 4. Šematski prikaz kompleksa NR2B/PSD-95/nNOS. Preuzeto od Wu i Tymianski, 2018 i potom modifikovano.

PSD-95 poseduje tri protein-vezujuća PDZ (engl. *PSD/ Discs-large/ ZO-1 homologous*) domena pomoću kojih stupa u interakciju sa CTD NR2B subjedinice i N-krajem  $\beta$ -prsta nNOS. Na ovaj način PSD-95 doprema nNOS u blizinu pore kanala NMDA receptora i izlaže ga ulaznoj struji Ca<sup>2+</sup> (Slika 4). Koncentracija Ca<sup>2+</sup> i blizina kompleksa Ca<sup>2+</sup>/kalmmodulin (Ca<sup>2+</sup>/CaM) su ključni za aktivnost nNOS. Naime, Ca<sup>2+</sup>/CaM se vezuje za nNOS i dovodi do konformacione promene čime se postiže uklanjanje autoinhibitornog elementa i njena aktivacija (Salerno i sar., 2013). nNOS dalje učestvuje u signalnoj transdukciji posredno preko NO ili neposredno ostvarujući fizičku interakciju sa drugim adapterskim proteinom CAPON (engl. *C-Terminal PDZ Domain Ligand Of Neuronal Nitric Oxide Synthase*), koji takođe sadži PDZ domen. CAPON se vezuje za protein

GTPazu Dexas1 (engl. *dexamethasone-induced Ras-related protein 1*) omogućavajući na taj način S-nitrozilaciju koja je neophodna za aktivaciju ove GTPaze (Zhou i Zhu, 2009; Chen i sar., 2013). Literaturni podaci pokazuju da aktivacija kompleksa nNOS/CAPON/Dexas 1 ima značajnu ulogu u neurotoksičnosti posredovanoj NMDA receptorom i oštećenju ćelije (Chen i sar., 2013).

## **Uloga NO u molekulskim promenama koje karakterišu moždanu ishemiju/reperfuziju**

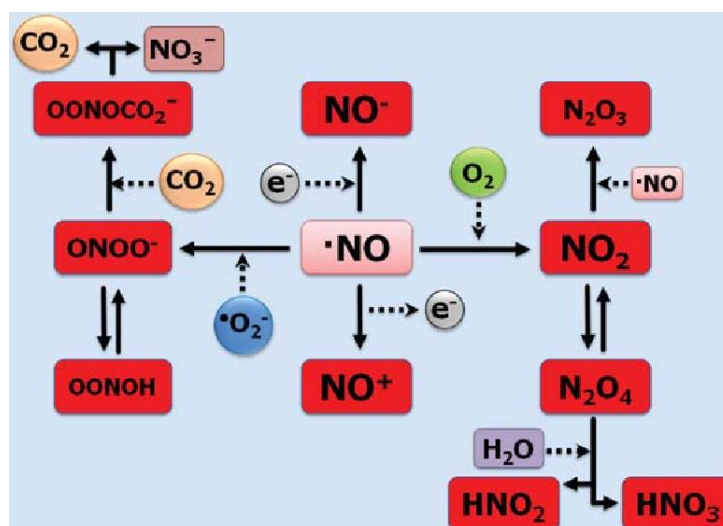
NO reguliše niz parametara neophodnih za održavanje homeosteze moždanog tkiva kao što su protok krvi i tonus krvnih sudova, neurotransmisija, sinaptička plastičnost i sinaptogeneza (Narne i sar., 2018).

Tokom I/R nivo NO raste, a uloga koju tom prilikom ostvaruje može biti dvojaka, u zavisnosti od količine NO u tkivu, izoforme enzima koji je uključen u njegovu sintezu i trenutnog mikrokruženja. U mozgu pacova i čoveka NO nastaje aktivnošću, ne samo nNOS, već i endotelne azot oksid sintaze (engl. *endothelial nitric oxide synthase- eNOS*) i inducibilne azot oksid sintaze (engl. *inducible nitric oxide synthase- iNOS*). Generalno, NO nastao delovanjem eNOS uglavnom je označen kao neuroprotektivan, dok nNOS i iNOS ostvaruju neurotoksičan efekat kako u ranoj tako u i kasnoj fazi I/R (Chen i sar., 2017b).

Povećanje nivoa NO može imati štetne efekte u ćeliji tako što deluje direktno na određene komponente ili procese. Povećan nivo NO direktno inhibira kompleks IV (citohrom C oksidaza) mitohondrijskog respiratornog lanca ugrožavajući na taj način proces oksidativne fosforilacije i vijabilnost ćelije (Trimmer i sar., 2001). Tokom i nakon I/R dolazi do pokretanja neuroinflamacije i naglog skoka NO što dovodi do aktivacije metaloproteinaza vanćelijskog matriksa koje vrše isecanje različitih komponenti matriksa, kao što su proteini uključeni u formiranje čvrste veze između endotelnih ćelija (engl. *tight junction proteins*), kompromitujući strukturu i stabilnost krvno-moždane

barijere (KMB) (Iadecola i Anrather, 2011). Pored već navedenih mehanizama direktnog štetnog delovanja, NO utiče na aktivaciju ciklooksigenaze-2 (COX-2) i povećanje produkcije prostaglandina E2 povećavajući na taj način neuroinflamatorni odgovor tokom I/R (Mollace i sar., 2005). Dodatno, NO dovodi do nitrozilacije proteina ćelije i narušavanja njihove biološke funkcije (Shahani i Sawa, 2012).

NO služi kao izvor niza RNS prevashodno peroksinitrita ( $\text{ONOO}^-$ ), azot (IV)-oksida ( $\text{NO}_2$ ) i azot (III)-oksida ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) te dovodi do nastanka nitrozativnog stresa (Slika 5) (Shahani i Sawa, 2012). U poređenju sa drugim radikalnim oblicima RNS,  $\text{ONOO}^-$  je usled najveće nestabilnosti, najreaktivniji i izaziva najveća oštećenja u ćeliji. Generalno,  $\text{ONOO}^-$  i druge slobodno-radikalne vrste, kao i neradikalni oblici ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ) mogu izazvati slična oštećenja kao i povećan nivo NO, a to su: nitracija i nitrozilacija proteina praćena gubitkom biološke funkcije, oštećenja na molekulu DNK, narušavanje KMB, povećanje lipidne peroksidacije, inhibicija kompleksa mitohondrijskog respiratornog lanca i drugo (Adams i sar., 2015; Sun i sar., 2018).



Slika 5. Šematski prikaz reaktivnih nitrozativnih vrsta i njihovog nastanka. Preuzeto od Tharmalingam i sar., 2017.

## Reaktivne oksidativne vrste kao uzrok oštećenja tokom i nakon moždane ishemije/reperfuzije

U fiziološkim uslovima, kada su koncentracije niske, ROS imaju značajnu ulogu u regulaciji funkcije imunskog sistema i održavanju redoks homeostaze, te predstavljaju neizostavne komponente i sekundarne glasnike mnogih signalnih puteva (Valko i sar., 2007). Iako mozak čini samo 2% ukupne telesne težine, 20% ukupne potrošnje kiseonika u organizmu pripisuje se upravo ovom organu, što za posledicu ima stvaranje veće količine različitih ROS u poređenju sa drugim organima (Sun i sar., 2018). Dodatno, lipidi u sastavu membrana neurona sadrže značajan udeo nezasićenih masnih kiselina, a citosol visoku koncentraciju gvožđa, te stoga ove ćelije predstavljaju prijemčivu „metu“ za delovanje ROS, što moždano tkivo čini podložnije oštećenjima (Dringen, 2000; Sun i sar., 2018). Kada koncentracija ROS u moždanom tkivu poraste iznad fiziološke vrednosti, uklanjanje prekomerno proizvedenih vrsta ključno je za održavanje homeostaze i sprečavanje oksidativnih oštećenja u ćeliji. Optimalan nivo ROS održavaju superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx), katalaza i drugi antioksidativni enzimi (AOE), štiteći tako moždano tkivo od oštećenja (Yoshioka i sar., 2002; Robinson i Winge, 2010; Sun i sar., 2018).

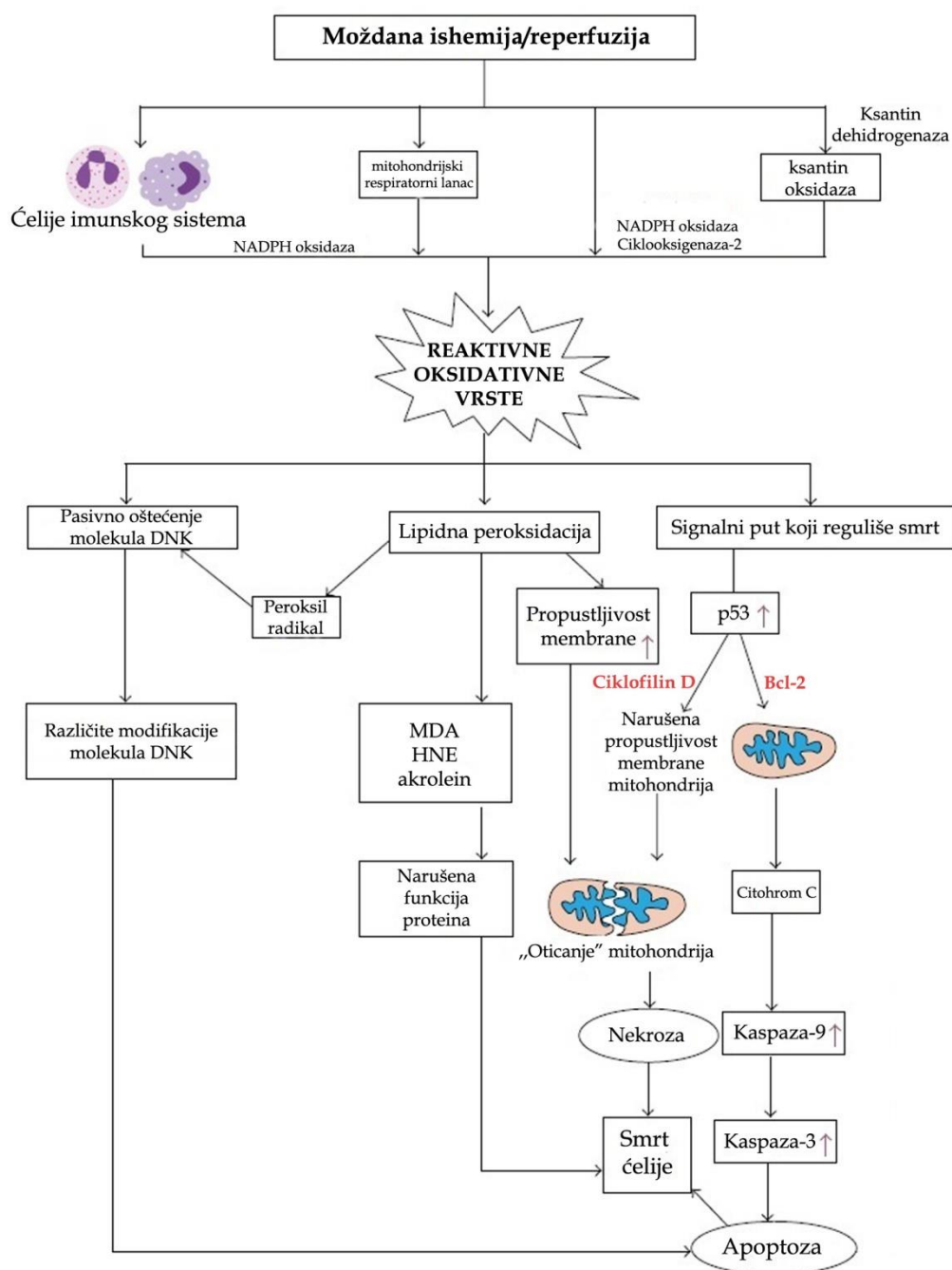
Dobro je poznato da oksidativni stres može da aktivira apoptotsku signalnu kaskadu, kao i da uzrokuje strukturne promene proteina i lipidnu peroksidaciju (Nelson i sar., 1992; Lee i sar., 2009; Lee i Koh, 2010; Granzotto i Sensi, 2015). Oksidativna oštećenja i modulacija biomolekula mogu direktno uticati na regulaciju različitih signalnih puteva (Takahashi i sar., 2011; Luczak i Anderson, 2014; Veit i sar., 2015; Sun i sar., 2018).

ROS može izazvati aktivna (ređe) ili pasivna oštećenja na molekulu DNK, te na taj način može učestvovati u pokretanju ćelijske smrti. Pasivna oštećenja DNK su uzrokovana ili direktinim reagovanjem ROS sa komponentama DNK ili indirektnom interakcijom produkata koji nastaju u reakciji između ROS i lipida ili proteina ćelije (Li i sar., 2011). Pored navedenog,



ROS mogu uticati na regulaciju i pokretanje pro-apoptostkih puteva i na druge načine. Reagujući sa ciklofilinom D, ROS mogu aktivirati protein p53 što rezultuje otvaranjem mitohondrijskih pora i potonjim kolapsom. ROS utiču na otpuštanje citohroma C iz mitohondrija i aktivaciju nishodnih kaspaza (Endo i sar., 2006; Gomez-Lazaro i sar., 2007; Vaseva i sar., 2012) (Slika 6).

U oštećenjima izazvanim delovanjem ROS u mozgu svakako najznačajniju ulogu imaju superoksid anjon,  $\text{OH}^-$ , i posredno vodonik peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Tokom i nakon I/R (posebno tokom faze reperfuzije), proizvodnja ROS značajno se povećava, te komponente antioksidativne zaštite postaju kompromitovane i AOE ne uspevaju da neutrališu nastale ROS (Sun i sar., 2018). U ishemijskoj fazi, ROS se uglavnom proizvode u mitohondrijama usled narušavanja njihove aktivnosti i funkcije (Drose i Brandt, 2012; Kalogeris i sar., 2014; Shenoda, 2015). U fazi reperfuzije, imunske ćelije stižu u region pogođen povredom i pokreće se neuroinflamatorni odgovor (Sun i sar., 2018), aktivira se NADPH oksidaza u imunskim ćelijama, što dovodi do oksidativnog praska (engl. *oxidative burst*), a to dodatno doprinosi stvaranju ROS (Walder i sar., 1997). Takođe, NADPH oksidaza se eksprimira i proizvodi ROS i u drugim tipovima ćelija kao što su vaskularne endotelne ćelije (Sun i sar., 2018).



Slika 6. Mehanizmi oštećenja u ćeliji uzrokovani delovanjem ROS tokom moždane I/R.

Preuzeto od Sun i sar., 2018 i potom modifikovano.

## **Promene povezane sa lipidnom peroksidacijom i odnosom redukovani/oksidovani glutation tokom moždane ishemije/reperfuzije**

Oksidativni stres dovodi do značajnih promena u propustljivosti membrane, transportu jona i funkciji organela procesom lipidne peroksidacije (Nigam i Schewe, 2000). Povećanje štetnih proizvoda lipidne peroksidacije, kao i promene sistema GSH/oksidovani glutation (GSSG) predstavljaju značajne faktore oštećenja prilikom I/R (Bhandari i Ansari, 2008; Schimidt i sar., 2014; Yaidikar i sar., 2014; Ren i sar., 2017).

Tokom I/R koncentracija slobodnih masnih kiselina, pre svega arahidonske kiseline, značajno se povećava. Fosfolipaze A2 i C, aktivirane povećanjem  $Ca^{2+}$ , hidrolizuju fosfolipide, dok resinteza istih zahteva očuvan energetske status, odnosno prisustvo ATP. Stoga, povećanje unutarćelijskog  $Ca^{2+}$  i poremećen energetske status, podstiču nastanak slobodnih masnih kiselina i oštećenje membrane (Warner i sar., 2004). Dodatno, usled narušenog oksidativnog statusa dolazi do povećanog formiranja ROS koji reaguju sa nezasićenim masnim kiselinama proizvodeći alkil radikal, koji dalje može formirati peroksil radikal ( $ROO\cdot$ ). Redukcijom  $ROO\cdot$  vodonikom iz druge masne kiseline formiraju se lipidni hidroperoksidi ( $ROOH$ ) i drugi alkil radikali, te se na ovaj način propagira ciklus lipidne peroksidacije. Pored navedenih direktnih štetnih delovanja, krajnji proizvodi lipidne peroksidacije poput malondialdehida (MDA), 4-hidroksinonenala (HNE) i akroleina mogu uzrokovati disfunkciju proteina vezivanjem za tiolne grupe kao i smanjenje redukovano glutationa (GSH) kroz reakciju sa GPx i glutation S-transferazom (GST), proizvodeći na taj način još ozbiljnija oštećenja (Esterbauer i sar., 1991; Parola i sar., 1999; Uchida, 1999; Sun i sar., 2018).

GSH, mali molekul sačinjen od tri aminokiseline, predstavlja esencijalnu komponentu antioksidativne zaštite mozga (Cooper i Kristal, 1997; Dringen, 2000). Poremećaj metabolizma GSH u mozgu uzrok je patogeneze ili posledica

mnogobrojnih neurodegenerativnih bolesti, uključujući i moždanu ishemiju (Cooper i Kristal, 1997; Dringen, 2000; Shaw, 1998). U reakciji sa peroksidima GSH se oksiduje do svog S-konjugata, GSSG. Ovu reakciju katalizuje GPx. U ćelijama se GSH regeneriše iz GSSG, reakcijom katalizovanom glutation-reduktazom (GR) (Cooper i Kristal, 1997; Shaw, 1998). Proizvodnja GSSG kao i transport GSH ili GSSG iz ćelija doprinose ukupnom smanjenju GSH u ćeliji (Cooper i Kristal, 1997; Shaw, 1998). Postishemični pad nivoa GSH, kao i smanjena aktivnost GPx i GR su dobro okarakterisani (Candelario-Jalil i sar., 2001; Sun i sar., 2018), budući da ROS produkovani tokom I/R mogu inaktivirati GPx (Pigeolet i Remacle, 1991) i GR (Huang i Philbert, 1996).

## **Pro-apoptotska signalizacija u ćeliji**

Apoptoza ili „programirana ćelijska smrt“ je proces kojim se uz aktivni utrošak energije i sintezu specifičnih proteina pokreće smrt ćelije kao sastavni deo fizioloških procesa ili kao odgovor na određena patološka stanja (Kerr i sar., 1972). Razlikuju se dva signalna puta pokretanja apoptoze- spoljašnji i unutrašnji. Spoljašnji put se pokreće vezivanjem specifičnih vanćelijskih liganda za receptore smrti, dok se unutrašnji put (mitohondrijski put) aktivira unutarćelijskim signalima. Bez obzira na poreklo signala, pro-apoptotski signalni put dovodi do aktivacije proteolitičkih enzima kaspaza koji katalizuju isecanje i uništavanje velikog broja različitih proteina u ćeliji.

### **Unutrašnji put apoptoze i uloga proteina Bcl-2 porodice**

Unutrašnji put može biti pokrenut delovanjem različitih faktora poput radijacije, hipoksije, hipertermije, infekcije, hiperprodukcije ROS/RNS, kao i gubitka faktora koji sprečavaju procese apoptoze (Marsden i Strasser, 2003). Ovaj signalni put označen je kao „Bcl-2 kontrolisani put“ ili „mitohondrijski put“, jer se njegova regulacija odvija posredstvom članova porodice proteina Bcl-2 (Cory i Adams, 2002), koji kontrolišu propustljivost mitohondrijske

membrane. Zajednička karakteristika ove proteinske porodice je da svi poseduju jedan ili više visokokonzerviranih domena označenih kao Bcl-2 homologni domeni (engl. *Bcl-2 homology domains*- BH1-4). Na osnovu strukture i funkcije članovi Bcl-2 porodice mogu se podeliti na:

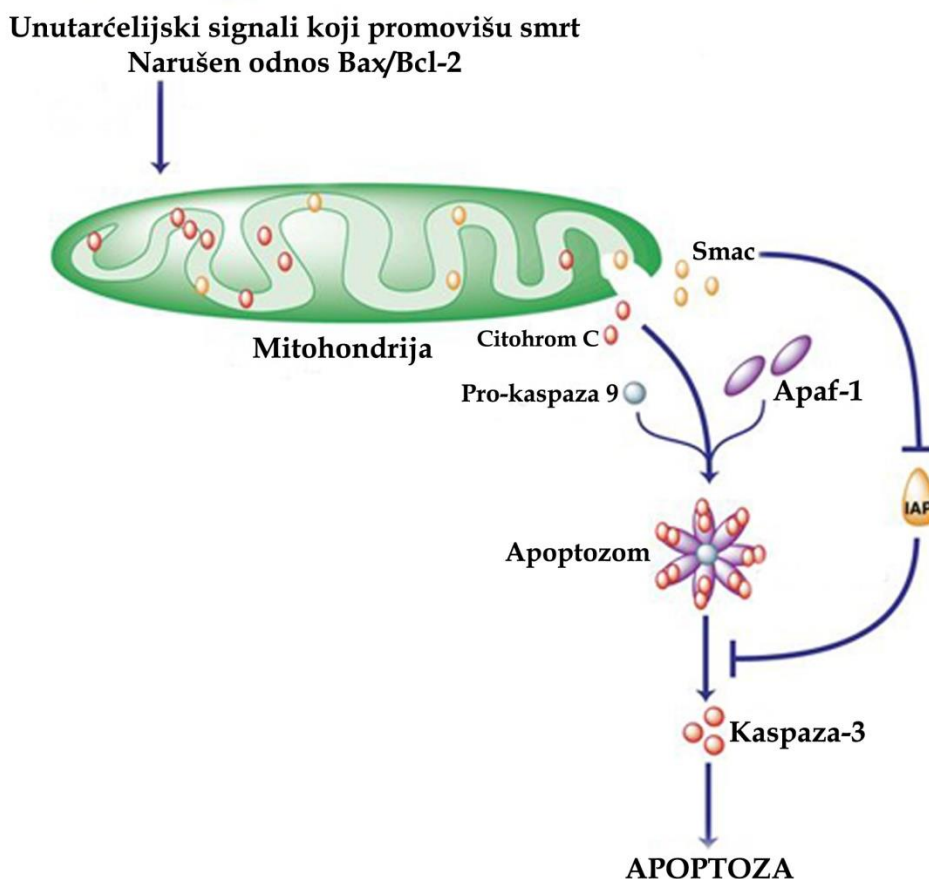
- anti-apoptotske proteine: Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*), Bcl-xL (engl. *B-cell lymphoma extra-large*), Bcl-W (engl. *Bcl-2-like protein 2*), Mcl-1 (engl. *induced myeloid leukemia cell differentiation protein*), Bcl-2A1 (engl. *Bcl-2 related protein A1*) i Bcl-B (engl. *Bcl-2-like protein similar in amino acid sequence to the Boo protein*).
- pro-apoptotske proteine koji se prema broju BH domena mogu podeliti u dve podgrupe. Prva podgrupa sadrži domene BH1-3. Predstavnicima ove podgrupe su: Bax (engl. *Bcl-2-associated protein X*), Bak (engl. *Bcl-2 homologous antagonist killer*) i Bok (engl. *Bcl-2-related ovarian killer*). Druga podgrupa proteina sadrži samo BH3 domen i u tu grupu spadaju: Bik (engl. *Bcl-2-interacting killer*), Hrk (engl. *Harakiri*), Bim (engl. *Bcl-2-like protein 11*), Bad (engl. *Bcl-2-associated death promoter*), Bid (engl. *BH3 interacting-domain death agonist*), PUMA (engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*), NOXA (engl. *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*) i Bmf (engl. *Bcl-2 modifying factor*) (Grilo i Mantalaris, 2019).

#### *Uloga Bax i Bcl-2 proteina u pro-apoptotskoj signalizaciji*

Odnos pro- i anti-apoptotskih članova Bcl-2 familije u mitohondrijama i njihovoj neposrednoj blizini presudan je za odgovor ćelije na pro-apoptotske signale te određuje sudbinu ćelije (Raisova i sar., 2001). Nedavne studije sugerisu da se Bax ugrađuje u mitohondrijsku membranu (MM) u obliku monomera koji nakon umetanja oligomerizuje i doprinosi povećanju propustljivosti spoljašnje MM (Subburaj i sar., 2015; Salvador-Gallego i sar., 2016). U odgovoru na pro-apoptotske signale Bcl-2 sprečava pokretanje apoptoze regulisanjem oslobađanja citohroma C i drugih proteina iz mitohondrija tako što: 1) sprečava premeštanje Bax i drugih pro-apoptotskih molekula iz citosola; 2) Bax/Bak oligomerizaciju u MM; 3) favorizuje zatvaranje prolazne

mitohondrijske pore (engl. *permeability transition pore*). Promena odnosa Bax/Bcl-2 u blizini MM u korist pro-apoptotskog Bax može rezultovati oslobađanjem citohroma C i Smac/Diablo (engl. *second mitochondria-derived activator of caspase protein/ direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*) iz mitohondrija. Smac/Diablo inhibira anti-apoptotske proteine IAP porodice (engl. *Inhibitor of Apoptosis*) (Adrain i sar., 2001), dok se citohrom C u citosolu udružuje sa proteinom Apaf-1 (engl. *apoptotic protease activating factor-1*) i prokaspazom-9 formirajući kompleks apoptozom, pri čemu dolazi do isecanja prokaspaze-9 i njene aktivacije u aktivnu kaspazu-9. Ova kaspaza dalje aktivira efektorske kaspaze, uglavnom kaspazu-3 (Slika 7). Ovaj korak se u apoptotskoj kaskadi uobičajeno označava kao „tačka bez povratka“ (Marsden i sar., 2004), iako postoje podaci koji ukazuju da aktivacija kaspaze-3 ne mora nužno rezultovati apoptozom (Zille i sar., 2012). U kasnijim fazama, pro-apoptotska signalna kaskada dovodi do aktivacije DNK endonukleaza koje vrše fragmentaciju DNK molekula i njegova nepovratna oštećenja (Marsden i Strasser, 2003).

Promene nivoa Bax i Bcl-2, kao i povećan odnos Bax/Bcl-2 pokazani su u brojnim studijama na životinjskim I/R modelima (Chen i sar., 2016; Chen i sar., 2017a; Hu i sar., 2017; Zeng i sar., 2018).

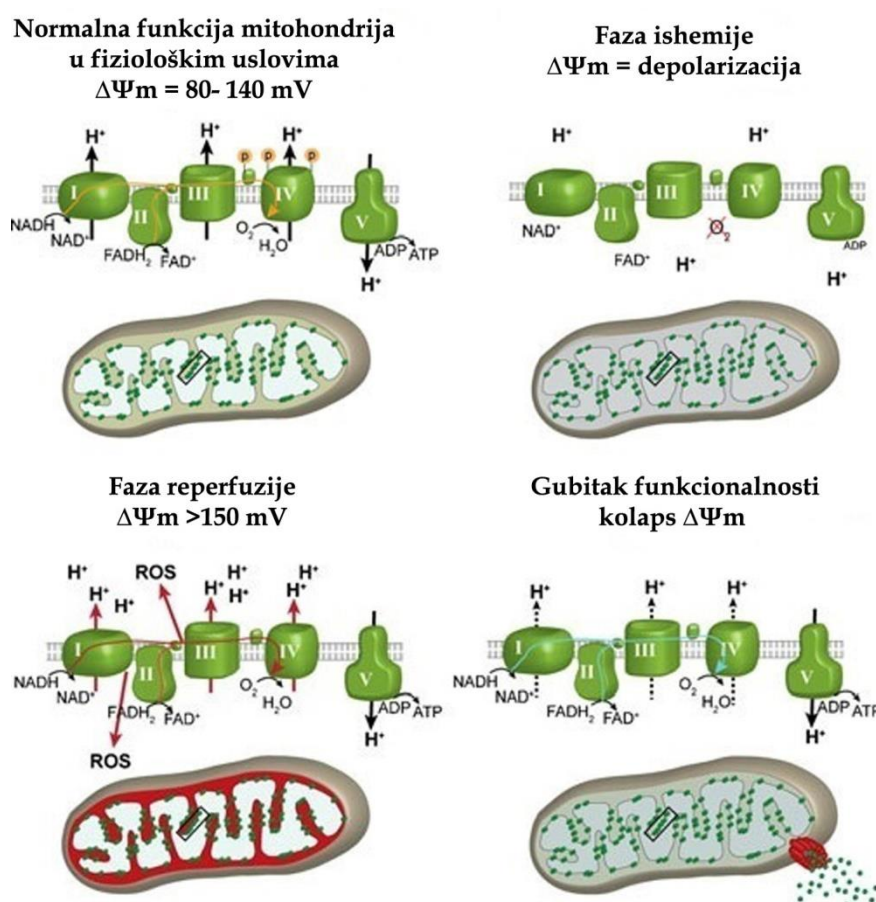


Slika 7. Prikaz pro-apoptotske transdukcije signala prilikom pokretanja apoptoze. Preuzeto od Placzek i sar., 2010 i potom modifikovano.

## Potencijal mitohondrijske membrane

Membranski potencijal mitohondrija ( $\Delta\Psi_m$ ) nastaje i održava se radom protonskih pumpi (Kompleksi I, III i IV) koje ulaze u sastav mitohondrijskog respiratornog lanca. Stabilan  $\Delta\Psi_m$  je neophodan za očuvanje energije tokom procesa oksidativne fosforilacije, kao i za transport različitih jona (najvažniji  $H^+$ ) i molekula esencijalnih za preživljavanje i aktivnost mitohondrija (Zorova i sar., 2018). Protonski gradijent i tako formiran transmembranski potencijal  $\Delta\Psi_m$  koriste se za proizvodnju ATP od strane ATP sintaze. Iako mogu postojati diskretne fluktuacije u sklopu normalne fiziološke aktivnosti,  $\Delta\Psi_m$  i nivo ATP održavaju se relativno stabilnim budući da su neophodni za očuvanje energetskeg statusa i preživljavanje ćelije. Dugotrajne promene  $\Delta\Psi_m$  su

izuzetno štetne, dovode do gubitka vijabilnosti ćelije i leže u osnovi mnogih oboljenja. Mitohondrije sa narušenim  $\Delta\Psi_m$  bivaju eliminisane, te on ostvaruje fundamentalnu ulogu u održavanju homeostaze celokupne mitohondrijske mreže. Stoga, promena  $\Delta\Psi_m$  neretko predstavlja znak da su u ćeliji pokrenuti patofiziološki mehanizmi (Zorova i sar., 2018). Promene  $\Psi_m$  okarakterisane su u određenim modelima I/R, gde finalnom gubitku funkcionalnosti mitohondrija prethode faze depolarizacije (ishemija) i hiperpolarizacije (reperfuzija) (Gao i sar., 2016; Sanderson i sar., 2013) (Slika 8).



Slika 8. Promene funkcije mitohondrija i  $\Delta\Psi_m$  tokom I/R. Preuzeto od Sanderson i sar., 2013 i potom modifikovano.



## Dehidroepiandrosteron

Dehidroepiandrosteron (DHEA) i njegov sulfatni estar dehidroepiandrosteron-sulfat (DHEAS) predstavljaju najzastupljenije steroidne hormone u ljudskom organizmu (Maninger i sar., 2009; Clark i sar., 2018). Nakon rođenja, nivo DHEA(S) opada i ostaje nizak sve do ulaska u pubertet nakon čega se aktivno sintetiše iz holesterola nizom biohemijskih reakcija i izlučuje iz retikularne zone (lat. *zona reticularis*) kore nadbubrega, te nivo hormona počinje da raste naglo u cirkulaciji (Parker i Odell, 1980; Havelock i sar., 2004). Koncentracija u cirkulaciji je najviša u dvadesetim godinama, nakon čega postepeno opada kod oba pola, a između 65.-te do 70.-te godine života ove koncentracije postaju najmanje (oko 20% maksimalne koncentracije u mladosti) (Maninger i sar., 2009).

DHEA i DHEAS su među najranije indentifikovanim neurosteroidima u mozgu pacova (Corpechot i sar., 1981; Corpechot i sar., 1983). Naime, 80'tih godina prošlog veka pokazana je veća koncentracija DHEA(S) u mozgu nego u plazmi, čak i nakon adenektomije i gonadektomije kod pacova (Corpechot i sar., 1981; Corpechot i sar., 1983). Ovi rezultati ukazali su da DHEA(S) nisu samo steroidni hormoni na periferiji, već da se sintetišu i u centralnom nervnom sistemu. *De novo* sinteza DHEA opisana je u mozgu pacova, žaba (Hojo i sar., 2004) i čoveka (Brown i sar., 2000), i to prevashodno u astrocitima i oligodendrocitima (Maurice i sar., 2006).

## Mehanizam delovanja dehidroepiandrosterona

### *Efekat dehidroepiandrosterona na jedarne receptore*

Steroidni hormoni regulišu transkripciju gena vezivanjem za specifične receptore lokalizovane u citoplazmi nakon čega se premeštaju u jedro, ili pak stupaju u direktnu interakciju sa jedarnim receptorima i/ili sekvencama na molekulu DNK koje sadrže odgovarajuća vezujuća mesta. Do danas, međutim,

nije okarakterisan nijedan specifični jedarni receptor koji poseduje visok afinitet za vezivanje DHEA ili DHEAS (Widstrom i Dillon, 2004; Webb i sar., 2006). DHEA može funkcionisati kao nespecifični ligand većeg broja jedarnih receptora za koje se vezuje sa znatno nižim afinitetom u odnosu na specifične ligande. Do sada je pokazano da se DHEA i/ili DHEAS vezuju za:

- jedarne receptore klase I (receptori za steroidne hormone): receptori za androgene (engl. *androgenic receptors*), estradiolski receptori  $\alpha$  i  $\beta$ ;
- jedarne receptore klase II (receptori koji dimerizuju sa retinoid X receptorom- RXR): PPAR $\alpha$  (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor a*), konstitutivni receptor za androstan (engl. *constitutive androstane receptor- CAR*), pregnanski receptor X (eng. *pregnane X receptor- PXR*) (Maninger i sar., 2009; Clark i sar., 2018).

Pored navedenog neposrednog delovanja, DHEA se može konvertovati u steroide koji imaju veći afinitet za vezivanje za jedarne receptore (7 $\alpha$ -hidroksi-DHEA, testosteron i estradiol), te time može posredno uticati na aktivaciju nekoliko različitih receptora u jedru (Labrie, 2004; Chalbot i Morfin, 2006). Na primer, 7 $\beta$ -hidroksi-epiandrosteron, metabolit DHEA, vezuje se za GPER (engl. *G-protein estrogen receptor*, ranije poznatijim pod nazivom GPR 30) i aktivira ga.

#### *Efekat dehidroepiandrosterona na receptore u mozgu*

DHEA(S) moduliše aktivnost nekoliko receptora za neurotransmitere, kao što su receptor za  $\gamma$ -aminobuternu kiselinu tipa A (GABA<sub>A</sub>R), NMDA receptor, sigma-1 receptor ( $\sigma$ 1R) (Maninger i sar., 2009; Clark i sar., 2018). DHEA i/ili DHEAS deluju na ove receptore kao:

- nekompetitivni antagonisti GABA<sub>A</sub>R, pri čemu DHEAS ispoljava jači antagonistički efekat (Majewska. 1992; Melchior i Ritzmann, 1994; Sousa i Ticku, 1997; Imamura i Prasad, 1998);
- pozitivni alosterični modulatori funkcije NMDA receptora (Baulieu, 1998; Compagnone i Mellon, 2000). Takođe, DHEA(S) povećava aktivaciju NMDA receptora posredno delovanjem na  $\sigma$ 1R;

- agonisti  $\sigma 1R$  (Maurice i sar., 2006, Maninger i sar., 2009).

Osim navedenog, potvrđeno je da se DHEA vezuje jačim afinitetom za citoskeletni protein MAP<sub>2C</sub> (engl. *microtubule-associated protein 2C*), koji se u mozgu eksprimira samo tokom razvića, osim u mirisnoj kržici i mrežnjači u kojima se eksprimira tokom celog života (Laurine i sar., 2003). DHEA se takođe vezuje za nespecifična receptorska mesta na endotelnim ćelijama koja su povezana sa aktivnošću eNOS (Liu i Dillon, 2002).

## Neurobiološki efekti dehidroepiandrosterona

Neurobiološki efekti DHEA i njegovog suflata mogu se ostvariti direktno ili indirektno putem metabolita ili intermedijera produkovanih tokom njihove biosinteze (Maninger i sar., 2009; Clark i sar., 2018). Pored toga što su direktna delovanja ona koja su od većeg značaja za fiziološke i patofiziološke mehanizme, potencijalni indirektni efekti su mnogobrojni i prožimaju skoro sve ćelijske nivoe, te će u ovoj doktorskoj disertaciji biti reči samo o direktnom uticaju DHEA.

Najznačajniji i najbolje opisani efekat DHEA je neuroprotektivni uticaj (Maninger i sar., 2009; Quinn i sar., 2018). Neuroprotektivni učinak pokazan je u modelima različitih patoloških stanja, kao što su moždana ishemija *in vivo* (Lapchak i sar., 2000; Li i sar., 2001) i *in vitro* (Marx i sar., 2000; Kaasik i sar., 2001), neurotoksičnost posredovana NMDA receptorom (Kimonides i sar., 1998; Kaasik i sar., 2001; Kurata i sar., 2004), povreda kičmene moždine kod miševa (Fiore i sar., 2004) i drugi. Opisan je blagotvoran efekat DHEA(S) na rast i razvoj neurita, kao i preživljavanje neurona i neurogenezu (Karishma i Herbert, 2002; Naert i sar., 2007; Sakr i sar., 2014). Dodatno, zabeležen je anti-oksidativni (Bastianetto i sar., 1999; Cardounel i sar., 1999; Tamagno i sar., 2003), anti-inflamatorni (Kalimi i sar., 1994; Chen i Parker, 2004) i anti-glukokortikoidni učinak egzogeno primenjenog DHEA(S) (Kalimi i sar., 1994; Kimonides i sar., 1999; Hu i sar., 2000; Karishma i Herbert, 2002), kao i efekat na sintezu i

sekreciju kateholamina (Svec i Porter, 1997; Sicard i sar., 2007; Perez-Neri i sar., 2008).

Prekliničke i kliničke studije pokazale su da suplementacija DHEA može biti potencijalno korisna u terapiji depresije, anksioznosti i drugih psihijatrijskih poremećaja (Maninger i sar., 2009; Quinn i sar., 2018). To potvrđuju nalazi o promenjenim nivoima endogenog DHEA(S) u mozgu u brojnim psihijatrijskim oboljenjima, poput depresije, šizofrenije, post-traumatskog stresnog poremećaja, u promenama raspoloženja i kognicije kod zdravih pojedinaca (Maninger i sar., 2009; Quinn i sar., 2018).

Važno je naglasiti da u zavisnosti od vremena primene, doze i prisustva drugih faktora (egzogenih tretmana, intoksikacija) DHEA može ostvarivati ne samo pozitivne, već i negativne efekte (Maninger i sar., 2009). Pa tako je *in vitro* neuroprotektivni učinak tretmana DHEA(S) okarakterisan u nekoliko studija isključivo nakon fizičkih/hemijskih povreda ili neurotoksikacije, dok u fiziološkim uslovima nije primećen nikakav efekat ili je češće dolazilo do pojave neurotoksičnosti (Maninger i sar., 2009). Pokazano je da pre-tretman DHEA(S) nema uticaja na preživljavanje neurona moždane kore pacova ukoliko nisu odgajani u uslovima anoksije (Marx i sar., 2000). Neurotoksičnost DHEA opisana je u kulturi hipokampalnih neurona, dok je ista doza DHEA primenjena zajedno sa kortikosteronom pokazala neuroprotektivan efekat na štetne promene izazvane ovim glukokortikoidom. Takođe, istraživanja u kulturi mišjih neurona i humanog neuroblastoma pokazala su da DHEA smanjuje vijabilnost ćelija (Gil-ad i sar., 2001).

## Dehidroepiandrosteron i moždana ishemija/reperfuzija

Vreme primene predstavlja značajan faktor koji određuje efekat DHEA, pogotovo u *in vivo* studijama moždane I/R (Lapchak i sar., 2000; Li i sar., 2009).

*In vivo* i *in vitro* studije pokazale su da DHEA može ostvariti neurotrofički i neuroprotektivni efekat putem blokade neurotoksičnosti uzrokovane NMDA receptorom (Kimonides i sar., 1998; Kurata i sar., 2004), ukazujući na njegov blagotvorni efekat i potencijalni terapijski kapacitet. Nasuprot tome, DHEA je okarakterisan i kao „ekscitatorni“ neurosteroid koji može pojačati odgovor NMDA receptora na NMDA u hipokampusu (Bergeron i sar., 1996). Oprečne rezultate dali su i Li i saradnici (2009), pokazavši da jednokratna primena DHEA u roku od 3 do 48 sati nakon I/R smanjuje smrt neurona i poboljšava nastali kognitivni deficit. Nasuprot tome, isti tretman 1 sat pre ili posle ishemije rezultovao je većim stepenom smrti neurona i pogoršanjem kognitivnih sposobnosti. Druga *in vivo* studija na zečevima, pokazala je neuroprotekciju posle tretmana DHEAS primenjenog 5 min nakon početka ishemije, dok je efekat izostao prilikom aplikacije 30 min nakon početka ishemije (Lapchak i sar., 2000). *In vitro* istraživanje na kulturi ćelija hipokampusa pokazalo je neuroprotektivan efekat DHEA(S), ukoliko se daje istovremeno sa NMDA, dok efekat izostaje ukoliko se primenjuju pre NMDA (Kurata i sar., 2004).

Uzimajući u obzir sve navedeno, delovanje DHEA u ishemičnom stanju ostaje nerazjašnjeno te još uvek nije poznato da li bi njegova primena bila opravdana u terapiji cerebro-vaskularnih bolesti koje su uzrokovane moždanom I/R.

# **CILJ ISTRAŽIVANJA**

Promene u signalizaciji posredovanoj NMDA receptorom predstavljaju jedan od ključnih mehanizama oštećenja usled I/R, a različite prekliničke terapijske strategije zasnovane su, upravo, na blokiranju neurotoksičnosti koja je izazvana narušavanjem ovog signalnog puta. Osnovni cilj ove doktorske disertacije bio je ispitivanje promena komponenti kompleksa NMDA receptora i njegove nishodne signalizacije u hipokampusu i prečenoj kori mužjaka pacova Wistar soja, 24 sata nakon podvezivanja obe zajedničke karotidne arterije u trajanju od 15 min. S obzirom na to da je postishemični tretman DHEA okarakterisan kao potencijalno neuroprotektivan, ispitivan je i efekat njegove primene 4 sata nakon hirurške procedure, kao i delovanje kod lažno operisanih jedinki.

U skladu sa zadatim ciljem, praćeni/e su:

1. senzo-motorne funkcije pacova;
2. prisustvo infarktne lezije na presecima celog mozga;
3. histo/morfološke i neurodegenerativne promene u hipokampusu i prečenoj kori pacova kao i imunoreaktivnost proteina NeuN (engl. *neuronal nuclear protein*);
4. nivo proteina vGluT1 i komponenti NMDA receptorskog kompleksa u sinaptozomima hipokampusa i prečene kore pacova;
5. nivo komponenti signalnih puteva nishodno od kompleksa NMDA receptora.

Istraživanja zasnovana na I/R modelima sa relativno kratkom fazom ishemije, poput modela korišćenog u ovoj doktorskoj disertaciji, mogla bi poslužiti kao smernice za predviđanje molekulskih promena karakterističnih za blagi moždani udar ili TIA, budući da su studije na pacijentima obolelim od TIA neizvodljive. Ovakva istraživanja su značajna za razumevanje patofiziologije blažih ishemičnih epizoda, uključujući TIA, i neophodna su u cilju pronalaženja odgovarajuće terapije.

# **MATERIJAL I METODE**



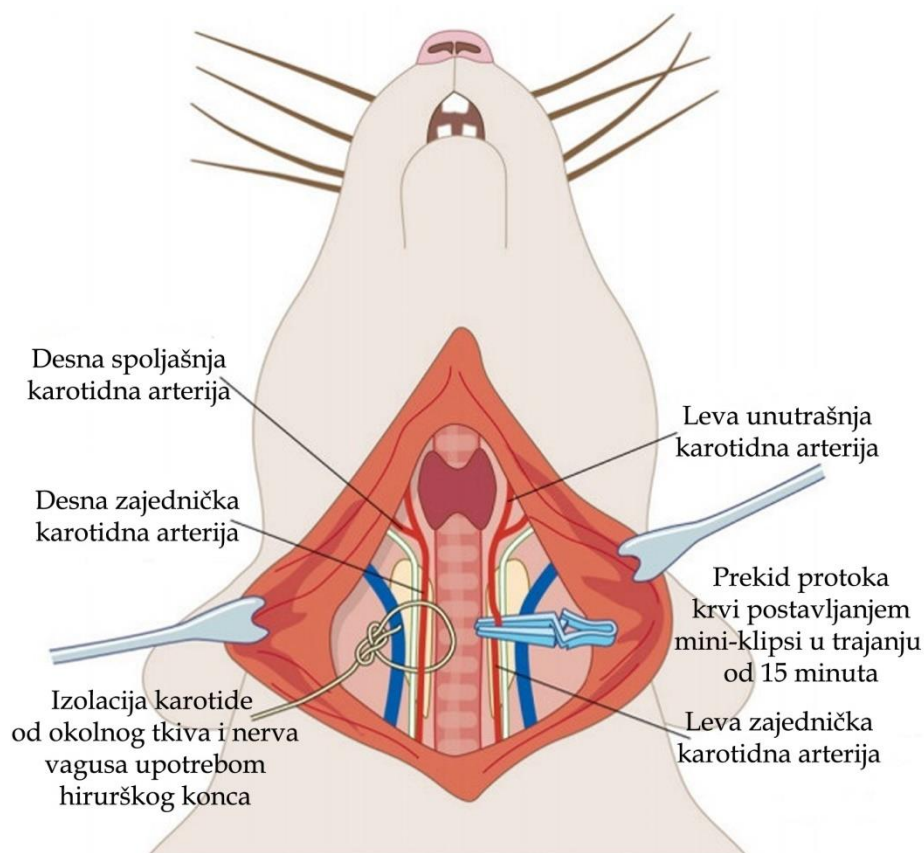
## **Etičke smernice i postupak sa eksperimentalnim životinjama**

U eksperimentima su korišćeni mužjaci pacova Wistar soja, starosti 3 meseca. Sve životinje su odgajane u vivarijumu Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke VINČA, u standardnim laboratorijskim uslovima (konstantna temperatura od  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , vlažnost vazduha od 55%, svetlosni režim 12 sati svetlost/ 12 sati mrak; 3–4 životinje po kavezu) i slobodnim pristupom hrani i vodi. Sve eksperimentalne procedure odobrene su od strane Etičkog komiteta za korišćenje laboratorijskih životinja Instituta za nuklearne nauke VINČA, Univerziteta u Beogradu, kao i od strane Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije, Uprave za veterinu (rešenja br.: 323-07-04254/2016-05 i 323-07-03311/2017-05). Rad sa eksperimentalnim životinjama odvijao se u skladu sa smernicama EU registrovanog „Srpskog udruženja za upotrebu životinja u istraživanju i obrazovanju“ (članice Federacije evropskih udruženja za laboratorijske životinje) i aktuelnih međunarodnih direktiva: „the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and associated guidelines“ i „National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 80-23, revised 1996)“.

### **Hirurška procedura**

Životinje su pre početka operativnog zahvata intraperitonealno (i.p.) anestetizirane koktelom ketamina (60 mg/kg) i ksilazina (10 mg/kg). Nakon anestetiziranja napravljen je rez na sredini ventralne strane vrata neposredno iznad grudne kosti, lokalizovane su leva i desna zajednička karotidna arterija i pažljivo razdvojene od okolnog tkiva i nerva vagusa. Svaka arterija je zatim podvezivana uz pomoć Yasargil® hirurških mini-klipsi za aneurizme (Braun, Nemačka) u trajanju od 15 min (Slika 9). Kontrolna grupa je lažno operisana

(engl. *sham*) odnosno jedinke su podvrgnute identičnom zahvatu sa izuzetkom podvezivanja arterija.



Slika 9. Prikaz podvezivanja zajedničkih karotidnih arterija pomoću mini-klipsi. Preuzeto od Wayman i sar., 2016 i potom modifikovano.

## Eksperimentalne grupe i tretman

Dimetil sulfoksid (DMSO, Sigma-Aldrich, Nemačka, 1.2 g/kg), korišćen kao rastvarač za DHEA, ili DHEA (Sigma-Aldrich, Nemačka, 20 mg/kg) injecirani su i.p. 4 sata nakon operacije i životinje iz svih eksperimentalnih grupa su žrtvovane 24 sata nakon operacije. Doza DHEA je izabrana prema radu Li i saradnika (2009), koji su pokazali neuroprotektivne efekte tretmana DHEA (20 mg/kg), 3 do 48 sati nakon prolazne globalne moždane ishemije kod pacova. U cilju izbegavanja mogućih efekta lažne operacije odnosno primenjene anestezije i DMSO na ispitivane parametre, pojedinačni uticaj faktora ispitivan

je na intaktnim i I/R pacovima koji nisu bili injecirani ni rastvaračem ni tretmanom. Pilot-eksperiment potvrdio je da lažna operacija/anestezija i primenjena doza DMSO nisu imale efekat na analizirane parametre (rezultati nisu prikazani), te je u ovoj eksperimentalnoj postavci kao kontrolna korišćena S+V grupa.

U navedenoj eksperimentalnoj postavci jasno su definisane 4 grupe:

- S+V grupa (kontrolna grupa) - lažno operisani pacovi tretirani DMSO;
- S+D grupa - lažno operisani pacovi tretirani DHEA;
- I/R+V grupa - pacovi podvrgnuti I/R i injecirani DMSO;
- I/R+D grupa - pacovi podvrgnuti I/R i tretirani DHEA.

Za izradu ove doktorske disertacije korišćeno je ukupno 118 životinja i to: 1) 78 (n = 19/20 po grupi) za ispitivanje senzo-motorne funkcije koje su nakon žrtvovanja upotrebljene i za druge analize; 2) 20 (n = 5 po grupi) za ispitivanja prisustva/odsustva infarktne lezije bojenjem trifeniltetrazolijum-hloridom (TTC); 3) 16 (n = 4 po grupi) za ispitivanje neurodegenerativnih promena Fluoro-Jade C (FJC) bojenjem, histološku analizu izvedenu primenom rutinskih histoloških bojenja i imunohistohemijsku analizu proteina NeuN; 4) 40 za izolaciju frakcije sinaptozoma (n = 10 po grupi, finalno n = 5 budući da su strukture iz dve životinje spajane tokom pripreme frakcije) i Western blot analizu komponenti NMDA receptorskog kompleksa; 5) 42 (n = 5/6 po grupi) za pripremu citosolne/mitohondrijske frakcije i intaktnih mitohondrija u kojima su ispitivani nivoi komponenti nishodne signalizacije posredovane NMDA receptorom.

## **Procena senzo-motorne funkcije životinja**

Dvadeset četiri sata pre i posle operacije senzo-motorne funkcije životinja procenjivane su grupom neuroloških testova kojima su ispitivani i ocenjivani sledeći parametri: 1) svest (0-1 poen), 2) disanje (0-1), 3) spontana aktivnost (0-3), 4) sposobnost hoda na prednjim ekstremitetima (0-2), 5) sposobnost penjanja (0-1), 6) sposobnost jasnog vida (0-1), 7), jačina hvatanja za rešetku kaveza (0-1), 8) pravilan položaj tela (0-2), 9) geotaksa (0-1), 10) sluh i 11) putanja i način kretanja u kavezu (0-1). Ukupni rezultat senzo-motorne funkcije izražavan je kao zbir prosečnih rezultata svih ispitivanih parametara pomoću skale od 0 do 15 poena (0- minimalni broj poena, 15-maksimalni broj poena).

## **Procena prisustva infarktne lezije bojenjem trifeniltetrazolijum-hloridom**

U kontaktu sa tkivom bezbojni TTC se redukuje i prevodi u formazan crvene boje delovanjem dehidrogenaza koje su najzastupljenije u vijabilnim mitohondrijama. Ukoliko je infarktne zona prisutna, tkivo ostaje neobojeno odnosno bele boje (Benedek i sar., 2006). Shodno tome, intenzitet boje i veličina neobojenih regiona je u pozitivnoj korelaciji sa veličinom i ozbiljnošću infarktne lezije i očuvanošću funkcije mitohondrija (Goldlust i sar., 1996).

Nakon dekapitacije mozgovi su pažljivo izvađeni i ohlađeni na -20°C nekoliko min kako bi se blago učvrstilo tkivo. Nakon toga načinjeni su serijski koronalni preseki (debljine 2 mm), počevši od olfaktornog bulbusa do malog mozga koji su odmah obojeni jednostavnim potapanjem u rastvor 1% TTC tokom 10 min na 37°C (Sigma-Aldrich, Nemačka). Preseci su fotografisani digitalnom kamerom odmah nakon bojenja i 24 sata nakon fiksacije u 4% paraformadehidu (PFA).

## **Priprema tkiva za histološku i imunohistohemijsku analizu**

Nakon dekapitacije mozgovi su pažljivo izolovani na ledu, fiksirani u 4% PFA tokom 24 sata na 4°C, i krio-zaštićeni dehidratacijom u rastućem gradijentu saharoze (10, 20 i 30% saharoza u 0.2 M fosfatnom puferu, pH 7.4) na +4°C. Koronalni preseći (debljine 18 µm) hipokampusa i prečione kore isećeni su na kriokatu (Leica CM 1860 UV, Nemačka), osušeni na vazduhu oko 2 sata i čuvani na -20°C do dalje upotrebe.

### **Bojenje Fluro-Jade C bojom**

U cilju detekcije prisustva/odsustva neurona u procesu degeneracije korišćena je FJC, anjonska fluorescentna boja, koja uspešno obeležava neurone pogođene neurodegenerativnim promenama (Ehara i Ueda, 2009). Pripremljeni preseći su temperirani oko 30 min na sobnoj temperaturi (RT), a potom potapani redom u PBS (0.01 M, pH 7.4) 5 min, 0.06% KMnO<sub>4</sub> 10 min, 2 × 2 min dH<sub>2</sub>O i 0.0001% rastvor FJC (Millipore, SAD) u 0.1% sirćetnoj kiselini 10 min. Pločice su potom ispirane u dH<sub>2</sub>O 3 × 1 min, dobro osušene i uranjane u ksilol posle čega su prekrivane medijumom za pokrivanje i pokrovnim staklom. Digitalne slike preseka slikane su na Zeiss Axiovert fluorescentnom mikroskopu (Zeiss, Nemačka) pri 200× uvećanju, i sačuvane u .tiff formatu.

### **Bojenje toluidin plavim**

Pripremljeni preseći su temperirani oko 30 min na RT i obojeni prema rutinskom protokolu za bojenje toluidin plavim (TB). Prvi korak podrazumevao je potapanje pločica u PBS (0.01 M, pH 7.4) 3 min, nakon čega je usledilo uranjanje u TB rastvor tokom 20 min. Preseći su potom ispirani 2 × 3 min u dH<sub>2</sub>O nakon čega je usledila serija ispiranja u etanolu (2 × 3 min 70% EtOH, 3 min 90% EtOH, 3 min 95% EtOH i 3 min 100% EtOH) i ksilolu (2 × 5 min).

Pločice su potom prekrivane medijumom za pokrivanje i pokrovnim staklom. Svi koraci izvođeni su na RT. Digitalne slike preseka su dobijene pomoću LEITZ DM RB svetlosnog mikroskopa (Leica Mikroskopie & Systems GmbH, Nemačka), LEICA DFC320 CCD kamere (Leica Microsystems Ltd., Švajcarska) i LEICA DFC Tvain softvera (Leica, Nemačka) pri 400× uvećanju, i sačuvane u .tiff formatu.

### **Bojenje hematoksilin-eozinom**

Pripremljeni preseci su obojeni primenom protokola za hematoksilin-eozin (H&M) bojenje. Ukratko, pločice su temperirane na RT oko 30 min i potopljene u rastvor hematoksilina 10 min. Nakon toga pločice su ispirane 2 × 1 min u dH<sub>2</sub>O, te su uranjane u rastvor eozina 2-3 sec i ponovo ispirane 2 × 1 min u dH<sub>2</sub>O. Potom je usledila serija ispiranja u etanolu (2 × 3 min 70%, 3 min 90%, 3 min 95% i 3 min 100%) i ksilolu (2 × 5 min). Svi koraci izvođeni su na RT. Digitalne slike su dobijene pomoću prethodno navedenog svetlosnog mikroskopa, kamere i softvera pri uvećanju 400x, i sačuvane u .tiff formatu.

### **Imunohistohemijska analiza NeuN proteina**

Pločice sa koronalnim presecima hipokampusa i prečione kore isprane su 2 × 5 min u PBS (0.01 M, pH 7.4) na RT. Da bi se inaktivirala endogena peroksidaza, preseci su uronjani u 0.3% rastvor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u metanolu tokom 20 min, te su ponovo ispirani 2 × 5 min u PBS na RT. Nakon blokiranja u 5% normalnom serumu magarca (Abcam, UK, # 7475) razblaženom u PBS u trajanju od 1 sata, na pločice je nanošeno anti-NeuN primarno antitelo (Tabela 1), razblaženo u 1% serumu magaraca u PBS i ostavljeno tokom noći. Sledećeg dana preseci su isprani u PBS 3 × 5 min i zatim je na njih nanošeno odgovarajuće sekundarno kozije anti-zečje antitelo (Santa Cruz Biotechnology, SAD, 1: 200) u 1% serumu magaraca u PBS tokom 2 sata na RT. Imunska reakcija je vizualizovana pomoću 3- 3' dimanobenzidina (DAB, Abcam, UK) i

digitalne slike su snimljene korišćenjem prethodno navedenog svetlosnog mikroskopa, kamere i softvera pri uvećanju 400x, i sačuvane u .tiff formatu.

## **Priprema homogenata celog tkiva, citosolne/mitohondrijske frakcije i intaktnih mitohondrija**

Posle žrtvovanja mozak je pažljivo izvađen, nakon čega su hipokampus i prečeaona kora izolovani na ledu. Pojedinačne moždane strukture su homogenizovane laganim pokretima gore-dole oko 20 puta u staklenom Potter-Elvehjem homogenizeru sa teflonskim tučkom koristeći dve zapremine hladnog homogenizacionog pufera (0.25 M saharoza, 15 mM Tris-HCl pH 7.4, 15 mM NaCl, 16 mM KCl, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA). Deo dobijenog homogenata celog tkiva (engl. *whole tissue homogenate*- WTH) odvojen je za analizu nivoa MDA, a ostatak je potom centrifugiran na 2000 g u trajanju od 10 min (centrifuga Eppendorf 5417, Nemačka). Supernatant (S1) je ispran uz pomoć dodatnog centrifugiranja na istoj brzini/vremenu, dok je talog dekantovan. S1 je potom centrifugiran na 15 000 g 20 min.

Nakon ovog koraka, dobijeni supernatant (S2) podvgnut je još jednom centrifugiranju, dok je talog (T2), koji sadrži mitohondrije, opran dodatnim centrifugiranjem na 15 000 g 20 min nakon čega je:

- rastvoren u puferu za mitohondrijsku lizu (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5% glycerol, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.05% Triton X-100), ostavljen tokom noći uz klackanje na +4°C i ujutru ispran dodatnim centrifugiranjem na 15 000 g 20 min. Talog je dekantovan, dok je supernatant odnosno mitohondrijska frakcija sačinjena od matriksa oslobođenog od membrana čuvana na -20°C do upotrebe ili;
- rastvoren u homogenizacionom puferu i opran dodatnim centrifugiranjem na 15 000 g 20 min. Supernatant je dekantovan, a

rezultujući talog koji sadrži intaktne mitohondrije sačuvan je i držan na  $-20^{\circ}\text{C}$  do dalje upotrebe.

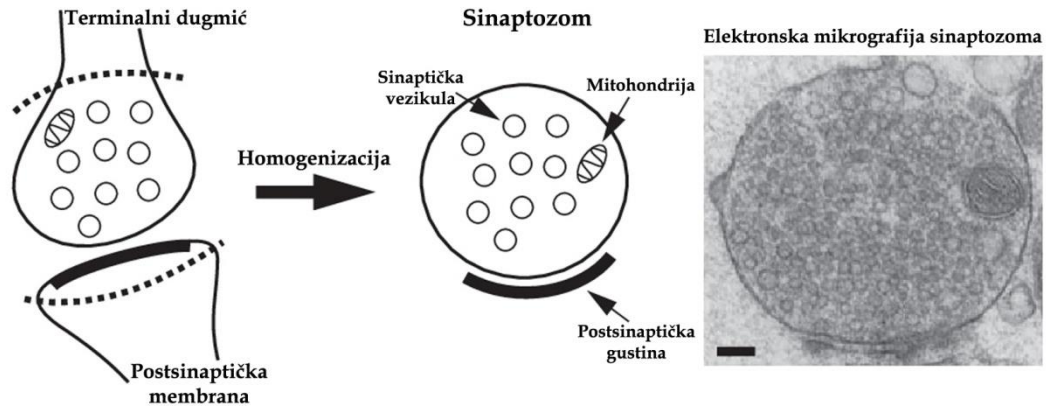
S2 supernatant koji sadrži neprečišćeni citosol ćelija centrifugiran je u cilju prečišćavanja na 100 000 g tokom 45 min (ultracentrifuga Beckman L8-M, rotor Ti 50, Nemačka). Talog je odbačen, dok je supernatant (prečišćeni citosol) sačuvan i držan na  $-20^{\circ}\text{C}$  do dalje upotrebe. Svi koraci centrifugiranja su izvođeni na  $4^{\circ}\text{C}$ .

Stepen prečišćenosti subćelijskih frakcija proveren je Western blot metodom odnosno imunodetekcijom mitohondrijskog proteina Hsp 60 i  $\beta$ -aktina (kontrola nalivanja), kako bi se isključila mogućnost kontaminacije frakcija.

### **Izolacija frakcije prečišćenih sinaptozoma**

Frakcija sinaptozoma se sastoji od zatopljenih membrana nervnih završetaka u čiji sastav ulaze citosol koji je raspoređen u blizini sinapse, sinaptičke vezikule i mitohondrije, te stoga predstavlja veoma dobar model za izučavanje molekulskih i funkcionalnih karakteristika sinapsi (Dunkley i sar., 2008). Postsinaptička membrana neurona sa pridruženim postsinaptičkim gustinama (engl. *post synaptic density*) ostaje asocirana sa kompleksom nervnog završetka i zatapa se sa lokalnim postsinaptičkim sadržajem (Corera i sar., 2009). S obzirom na to da neuroni ne mogu ostati intaktni nakon homogenizacije tkiva, nervni završeci se u izotoničnoj sredini otkidaju od aksona, a membrane terminalnih dugmića nervnih završetaka i dendritskih trnčića sa kojim uspostavljaju sinapse se zatvaraju formirajući sinaptozom (Slika 10). Ove vezikule mogu biti prečišćene centrifugiranjem na gradijentu koncentracija saharoze, Percoll-a ili Ficoll-a, a čistoća ove subćelijske frakcije je zadovoljavajuće čistoće te je moguće vršiti različite studije fizioloških i farmakoloških aspekata sinaptičke funkcije (Dunkley i sar., 2008).





Slika 10. Sinaptozom; šematski prikaz (levo i centralno) i elektronska mikrografija preparata sinaptozoma (desno). Preuzeto od Evans, 2015 i potom modifikovano.

Nakon vađenja, mozak je ispiran u izolacionom puferu (0.32 M saharoza, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4) i prečišćeni sinaptozomi su izolovani po prethodno opisanom protokolu (Cotman i Matthews, 1971; Horvat i sar., 2001). Hipokampus i prečeaona kora izolovani su na ledu, izmereni i stavljeni u 10 zapremina izolacionog pufera (spajana su po 2 regiona iste grupe) i homogenizovani sa 10 pokreta gore-dole pomoću staklenog homogenizera sa teflonskim klipom (zazor između homogenizera i klipa = 0.20 mm). Homogenat je dalje centrifugiran 10 min na 1000 g (centrifuga Beckman, JA-20, Nemačka). Supernatant je odlivan i sačuvan, a talog, u kome su nehomogenizovani fragmenti i jedra, ispiran sa 10 volumena izolacionog pufera, centrifugiranjem pri istim uslovima. Potom su supernatanti iz oba centrifugiranja spajani i centrifugirani 20 min na 12 000 g (centrifuga Beckman, rotor JA-20, Nemačka). Ovako dobijeni talog sadrži sinaptozome, gliozome (zatopljene delove astrocita), mijelin, ukupne mitohondrije i deo membranskih fragmenata poreklom od liziranih neurona te se označava kao neprečišćeni sinaptozomalni preparat ili gruba membranska P2 frakcija. Dobijena P2 frakcija rastvarana je u izolacionom puferu i nanošena na ranije pripremljen i ohlađen dvofazni gradijent saharoza-Ficoll koji sadrži 13% i 7.5% Ficoll rastvoren u puferu (0.32 M saharozi, 50  $\mu$ M EDTA, 5mM Tris-HCl pH 7.4). Nakon centrifugiranja na 65 000 g u trajanju od 55 min na ultracentrifugi (centrifuga Beckman, rotor SW 41,

Nemačka), sinaptozomi su prikupljeni iz međusloja 13% i 7.5% faze i ispirani u izolacionom medijumu centrifugiranjem 25 min na 15 000 g (centrifuga Beckman, rotor JA-20, Nemačka) (Dunkley i sar., 2008). Supernatant je odlivan, a dobijeni talog sa prečišćenim sinaptozomima je resuspendovan u 5 mM Tris-HCl pH 7.4 i čuvan na -20°C do korišćenja.

## **Biohemijske analize**

### **Određivanje koncentracije proteina**

Koncentracija proteina u uzorcima je određivana po metodi Lowry-a (Lowry i sar., 1951) modifikovanoj po Markwell-u (Markwell i sar., 1978). Kao standard za određivanje koncentracije proteina korišćen je albumin goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*- BSA, Sigma- Aldrich, Nemačka).

U eksperimentalnom postupku su korišćeni sledeći reagensi:

- reagens A: 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0.4% NaOH + 0.16% Na-K-tartarat + 1% SDS;
- reagens B: 4% CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O,
- reagens C: reagens A + reagens B (odnos 100:1), pravi se neposredno pre upotrebe;
- reagens D: Folin & Ciocalteus Phenol reagens razblažen u dH<sub>2</sub>O (odnos 1:1).

Svaki uzorak/standard je meren u triplicatu. Slepa proba (blank) je sadržala 900 µl dH<sub>2</sub>O, bez proteina, dok je u ostale epruvete dodavano po 10 µl rastvora uzorka/standarda i dH<sub>2</sub>O do finalne zapremine od 900 µl. U epruvete je potom sipano po 100 µl 1 M NaOH, dobro promešano i potom inkubirano 10 min na RT. Nakon toga je dodavano 3 ml reagensa C, ponovo promešano i ostavljano 20 min, te je zatim dodavano 0.3 ml reagensa D, ponovo promešano i ostavljano 45 min na RT do razvijanja boje. Optička gustina (OG) je merena na talasnoj dužini 750 nm na spektrofotometru (S-30 Boeco, Nemačka). Na osnovu

očitanih vrednosti OG standarda konstruisana je prava i sa nje je određivana koncentracija proteina u uzorku na osnovu očitane OG uzorka.

### **Merenje nivoa malondialdehida u homogenatu celog tkiva hipokampusa i prečone kore**

MDA predstavlja najčešće korišćen biomarker lipidne peroksidacije (pre svega omega-3 i omega-6 masnih kiselina), a za merenje njegove vrednosti koristi se esej zasnovan na reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom (engl. *thiobarbituric acid*- TBA) (Ayala i sar., 2014). Sadržaj MDA u WTH hipokampusa i prečone kore procenjen je pomoću modifikovanog TBA eseja prethodno opisanog od strane Popov i saradnika (2011). Ukratko, 50  $\mu$ l celog homogenata tkiva resuspendovano je u 950  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl pH 7.4 i pomešano sa 2 ml TBA reagensa (0.375% TBA, 0.25 M HCl, 15% trihloroetena kiselina). Reakciona smeša je stajala 1 sat na 95°C u vodenom kupatilu i nakon hlađenja centrifugirana na 3000 g 10 min (centrifuga Eppendorf 5417, Nemačka). OG supernatanta je merena spektrofotometrijski na 535 nm (S-30 Boeco, Nemačka). Sadržaj MDA u WTH je izračunat korišćenjem standardne krive konstruisane pomoću rastvora poznate koncentracije MDA (Sigma Aldrich, Nemačka).

### **Merenje nivoa metabolita azot oksida (NOx-) u citosolnoj frakciji hipokampusa i prečone kore**

Nivo NO je procenjen na osnovu merenja njegovih metabolita- NO<sub>2</sub><sup>-</sup> i NO<sub>3</sub><sup>-</sup> u citosolnoj frakciji hipokampusa i prečone kore. Nivo NOx<sup>-</sup> je određivan kolorimetrijskim esejem prema neznatno izmenjenoj prethodno opisanoj metodi Navarro-González i saradnika (1998). Ukratko, smeša koja sadrži jednake zapremine uzorka i Griess reagensa (5% fosforna kiselina, 0.1% naftiletildiamin dihidrohlorid, 1% sulfanilamid) je držana 10 min na RT. OG reakcione smeše je merena na talasnoj dužini 540 nm na ELISA čitaču (WALLAC 1420-Victor2 Multilabel Counter, LKB, SAD), a koncentracija NOx<sup>-</sup>

očitan je sa standardne krive koja je dobijena iz serije poznatih koncentracija NaNO<sub>2</sub>.

## **Određivanje nivoa redukovanog glutationa u citosolnoj frakciji hipokampusa i prečone kore**

Nivo GSH u citosolu hipokampusa i prečone kore određivan je Elmanovom metodom (Ellman, 1959), modifikovanom od strane Hisin-a i Hilf-a (Hissin i Hilf, 1976). Esej se zasniva na redukciji 5,5-ditio-bis-nitrobenzoeve kiseline (DTNB) SH grupama GSH i formiranju 2-nitro-5-merkaptobenzoeve kiseline pri čemu dolazi do jasno uočljive promene boje u jako žutu. Sveže pripremljeni uzorak citosola (20 µl) rastvoren je u reakcionoj smeši (10 mM Tris-HCl pH 8.2, 1 mM EDTA, 26.6 % metanol, 150 µM DTNB) i centrifugiran na 3000 g 5 min na RT (centrifuga Eppendorf 5417, Nemačka). OG uzorka je očitavana spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 405 nm (S-30 Boeco, Nemačka). Kalibraciona kriva napravljena je koristeći različita razblaženja komercijalno dostupnog GSH (Sigma-Aldrich, Nemačka).

## **Western blot analiza proteina u hipokampusu i prečonoj kori**

### *Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu*

Elektroforeza proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) predstvalja standardnu proceduru za razdvajanje proteina na osnovu razlika u molekulskim masama (MW). Poliakrilamidni gel nastaje polimerizacijom 30% akrilamida i 0.8% N,N-metilenbis-akrilamida koja se inicira i katalizuje dodavanjem amonijum persulfata i tetrametil-etilendiamina. Povećanjem zastupljenosti akrilamida u gelu smanjuje se veličina pora i reguliše procentualnost gela. Za potrebe eksperimenta korišćen je 8% do 15% gel za razdvajanje i 5% gel za koncentrovanje. Pre početka nalivanja uzoraka u bunariće na gelu za

koncentrovanje količina proteina u uzorcima bila je svedena na istu razblaživanjem u puferu (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 30% glicerol, 5%  $\beta$ -merkaptoetanol, 0.02% bromofenol plavo). Nakon toga uzorci su zagrevani 5 min na 100°C kako bi došlo do denaturacije ispitivanih proteina čime je omogućeno razdvajanje proteina isključivo prema MW. Pored uzoraka na svaki gel je nanošen i „marker“ odnosno skup proteina poznatih molekulskih masa (Thermo Scientific Prestained Protein Molecular Weight Marker, SAD), u cilju lokalizacije ciljnog proteina. Elektroforeza proteina u puferu (0.25 M TRIS- HCl, 0.192 M glicin, 0.1% SDS) je u proseku trajala oko 120 min na konstantnom naponu od 120 V. Elektroforetski razdvojeni proteini prenošeni su sa gela na poliviniliden fluorid membranu (PVDF, Imobilion-P membrana, Millipore, SAD) koje su prethodno aktivirane potapanjem u 100% metanol 15 sec, a zatim su ispirane u dH<sub>2</sub>O 2 min i potapane u pufer za transfer (20% metanol, 0.025 M TRIS- HCl, 0.192 M glicin, pH 8.3). Potom su gel i membrana slagani u sendvič između suđera i filter papira (Whatman Inc, UK) sledećim redosledom: suđer / filter papir/ gel / membrana / filter papir / suđer, uz istiskivanje mehurića vazduha između slojeva. Tako pripremljeni, gel i membrana su uranjeni u sistem za vlažni transfer MINI GEL TRANSBLOTTER (Apelex, Francuska) gde su se negativno naelektrisani proteini, posredstvom pufera za transfer, kretali u smeru pozitivno naelektrisane elektrode nailazeći na membranu koja ih zaustavlja i vezuje.

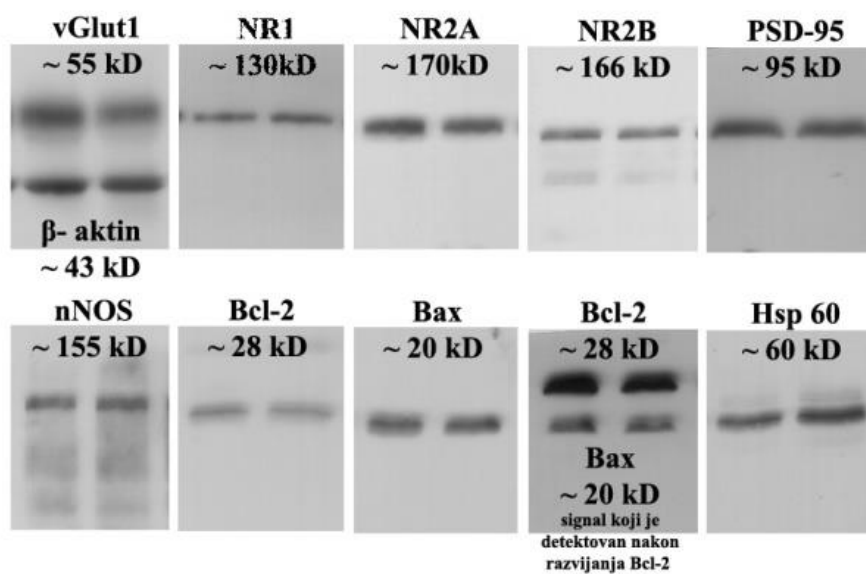
### *Imunodetekcija proteina od interesa*

U cilju imunodetekcije proteina membrane su nakon transfera potapane u 5% rastvor BSA u TBST (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) 1 sat, kako bi se umanjilo nespecifično vezivanje. Posle blokiranja, membrane su ostavljane u odgovarajućem primarnom antitelu na 4°C preko noći (Tabela 1) kako bi se postiglo njegovo specifično vezivanje za ispitivane proteine. Nakon 3 × 10 min ispiranja u TBST, membrana je tokom 1 do 2 sata držana u odgovarajućem sekundarnom antitelu. Posle još jedne serije ispiranja

u TBST puferu, membrane su inkubirane sa rastvorom za detekciju (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore, SAD) koji reaguje sa peroksidazom rena, nakon čega dolazi do emisije fotona koja se uočava na fotoosetljivom filmu smeštenom u kaseti za detekciju (Hypercasette, Amersham Life Science, SAD). Primenjena primarna antitela pokazala su visoku specifičnost za ciljane antigene, te su tokom detekcije uočene jasno definisane trake na predviđenim molekulskim težinama (Slika 11). Filmovi su skenirani, a imunochemiluminescentni signal (poreklom od ciljnog proteina) kvantifikovan je denzitrometrijski u programu za analizu slike ImageJ (SAD). Koncentracija proteina je izražavana kao broj arbitrarnih jedinica po  $\mu\text{g}$  ukupnih proteina, odnosno procentualnom razlikom u odnosu na kontrolu.

Lista primarnih antitela				
Antigen	Proizvođač i kataloški broj	Domaćin	Razblaženje	MW(kDa)
<b>Bax</b>	Cell Signaling #2772	zečije poliklonsko	1: 1000	20
<b>Bcl-2</b>	Cell Signaling #2876	zečije poliklonsko	1: 1000	28
<b>Hsp 60</b>	Santa Cruz Biotechnology 13115	mišije monoklonsko	1:1000	60
<b>Neu N</b>	Abcam 104225	zečije poliklonsko	1:500	48
<b>nNOS</b>	Santa Cruz Biotechnology 5302	mišije monoklonsko	1: 5000	155
<b>NR1</b>	Millipore 05-432	mišije monoklonsko	1: 1000	130
<b>NR2A</b>	Millipore 05-901R	zečije monoklonsko	1: 1000	170
<b>NR2B</b>	Abcam 93610	mišije monoklonsko	1: 5000	166
<b>PSD-95</b>	Millipore MAB 1598	mišije monoklonsko	1:5000	95
<b>vGlut1</b>	Abcam 134283	mišije monoklonsko	1:1000 za HIP 1:4000 za PFC	55
<b>β-actin</b>	Thermo Fisher Scientific PA1-21167	zečije poliklonsko	1:5000	43
<b>β-actin</b>	Santa Cruz Biotechnology 1615	kozije poliklonsko	1:500	43
Lista sekundarnih antitela				
Tip i vrsta antitela	Proizvođač i kataloški broj	Razblaženje		
<b>anti-kozija IgG HRP konjugovana</b>	Santa Cruz Biotechnology 2033	1:5000		
<b>anti-zečija IgG HRP konjugovana</b>	Santa Cruz Biotechnology 2030	1:5000-1:10000		
<b>anti-mišija IgG HRP konjugovana</b>	Santa Cruz Biotechnology 2318	1:5000-1:10000		

Tabela 1. Lista korišćenih primarnih i sekundarnih antitela.



Slika 11. Prikaz specifičnosti primarnih antitela korišćenih u Western blot metodi.



## Merenje potencijala mitohondrijske membrane u hipokampusu i prečenoj kori

Merenje  $\Delta\Psi_m$  vršeno je prema metodi prethodno opisanoj od strane Petrovic i saradnika (2011). Metoda se zasniva na činjenici da dodavanje „respiratorno sposobnih“ intaktnih mitohondrija u rastvor boje rodamina 123 (RH 123) uzrokuje smanjenje intenziteta fluorescencije rastvora usled ulaska boje u mitohondrije. Ukoliko je  $\Delta\Psi_m$  narušen, intenzitet fluorescencije se ponovo pojačava usled izlaska boje iz mitohondrija i na kraju merenja se ne registruje smanjenje fluorescencije. Stoga, prvi korak podrazumevao je merenje fluorescencije reakcione smeše (10 nM RH 123, 0.25 M saharoza, 15 mM Tris-HCl pH 7.4, 15 mM NaCl, 16 mM KCl) na ELISA čitaču (WALLAC 1420-Victor2 Multilabel Counter, LKB, SAD) na talasnoj dužini od 538 nm. Zatim su u bunariće mikroploče, gde se nalazila reakciona smeša, direktno dodavane intaktne mitohondrije i intenzitet fuorescencije je ponovo očitao na 538 nm nakon 10 min. Finalna koncentracija proteina u reakcionoj smeši iznosila je 3 mg/ml. Svi eksperimentalni koraci rađeni su u mraku na RT.

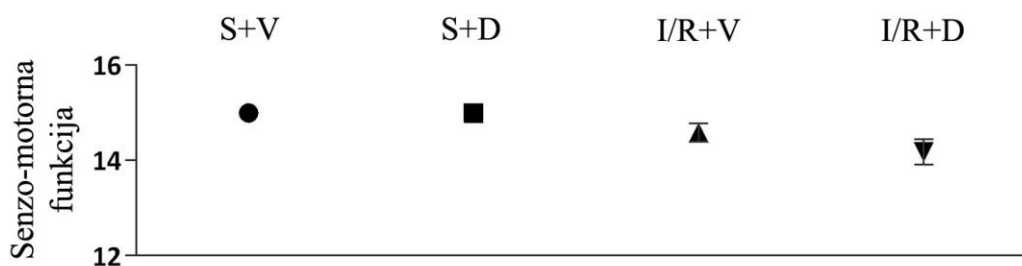
### Statistička obrada rezultata

Rezultati su izražavani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM i predstavljani kao procenat kontrolne (S+V) grupe (izuzev merenja nivoa MDA i GSH koji su izražavani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM). Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su određene korišćenjem dvofaktorijalne analize varijanse (engl. *two way analysis of variance*- two-way ANOVA), praćene post hoc *Tuckey* testom. Kao statistički značajne razlike smatrane su one čija je *p* vrednost bila manja od 0.05.

# REZULTATI

## Kratkotrajna ishemija/reperfuzija i tretman dehidroepiandrosteronom ne dovode do pojave senzo-motornih deficita

Nizom neuroloških testova ispitana je senzo-motorna funkcija životinja u svim eksperimentalnim grupama neposredno pre operativnog zahvata i nakon 24 sata. Neurološka procena je pokazala očuvanu senzo-motornu funkciju životinja u svim eksperimentalnim grupama tokom kontrolnog preoperativnog i postoperativnog testiranja (Slika 12).

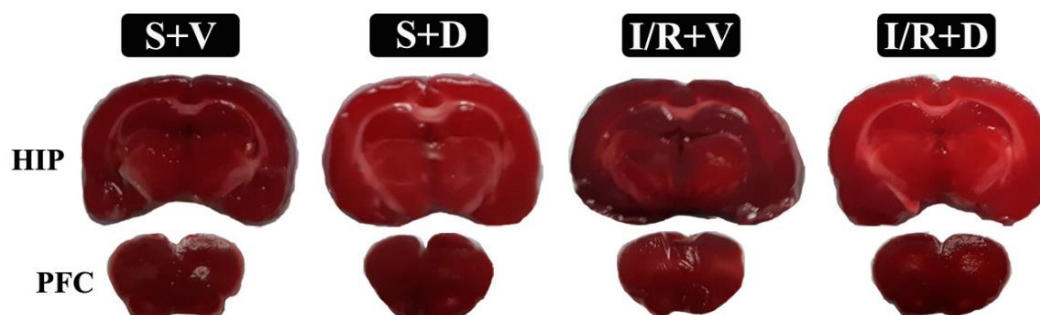


Slika 12. Prikaz ukupne ocene senzo-motorne funkcije; n = 19/20 po grupi.

## Određivanje prisustva infarktne lezije nakon ishemije/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom

Na izolovanim mozgovima nisu uočene grube lezije vidljive golim okom ni u jednoj eksperimentalnoj grupi.

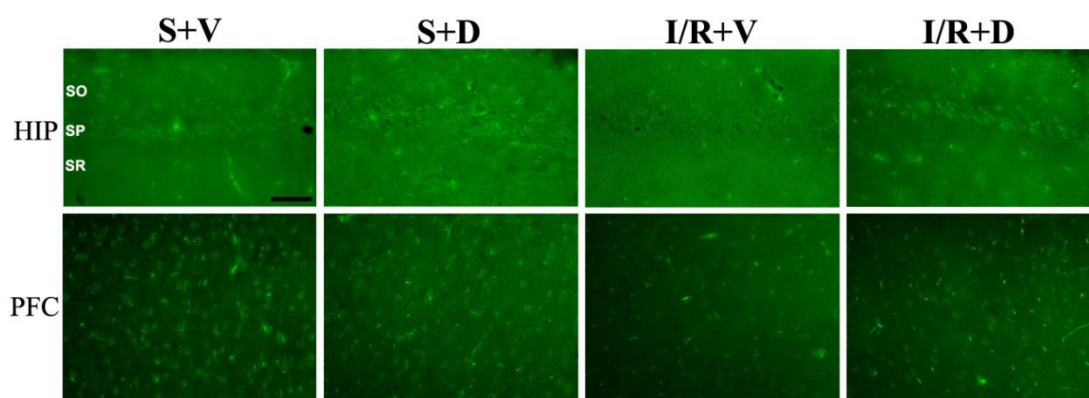
TTC bojenje koronalnih preseka celog mozga nije pokazalo prisustvo infarktne lezije ni u jednoj od eksperimentalnih grupa. Normalno, neoštećeno tkivo bilo je tamnocrveno nakon bojenja, bez tragova fokalno grupisanog belog bojenja karakterističnog za prisustvo ishemijske lezije (samo koronalni preseki hipokampusa i prečione kore su prikazani na Slici 13).



Slika 13. Prikaz TTC bojenja koronalnih preseka hipokampusa (gornji red) i prečione kore (donji deo); n = 5 po grupi. Tkivo je tamnocrvene boje, a prisustvo ishemijske lezije nije primećeno ni u jednoj eksperimentalnoj grupi. HIP- hipokampus; PFC- prečiona kora.

## Kratkotrajna ishemija/reperfuzija i tretman dehidroepiandrosteronom ne dovode do neurodegenerativnih promena u hipokampusu i prečeojoj kori

FJC bojenje pokazalo je odsusutvo neurodegenerativnih promena u hipokampusu i prečeojoj kori svih eksperimentalnih grupa. Na koronalnim presecima hipokampusa i prečeoone kore uočeno je isključivo nespecifično pozadinsko bojenje i autofluorescencija, dok specifično obojeni neuroni pogođeni neurodegeneracijom nisu primećeni (Slika 14).



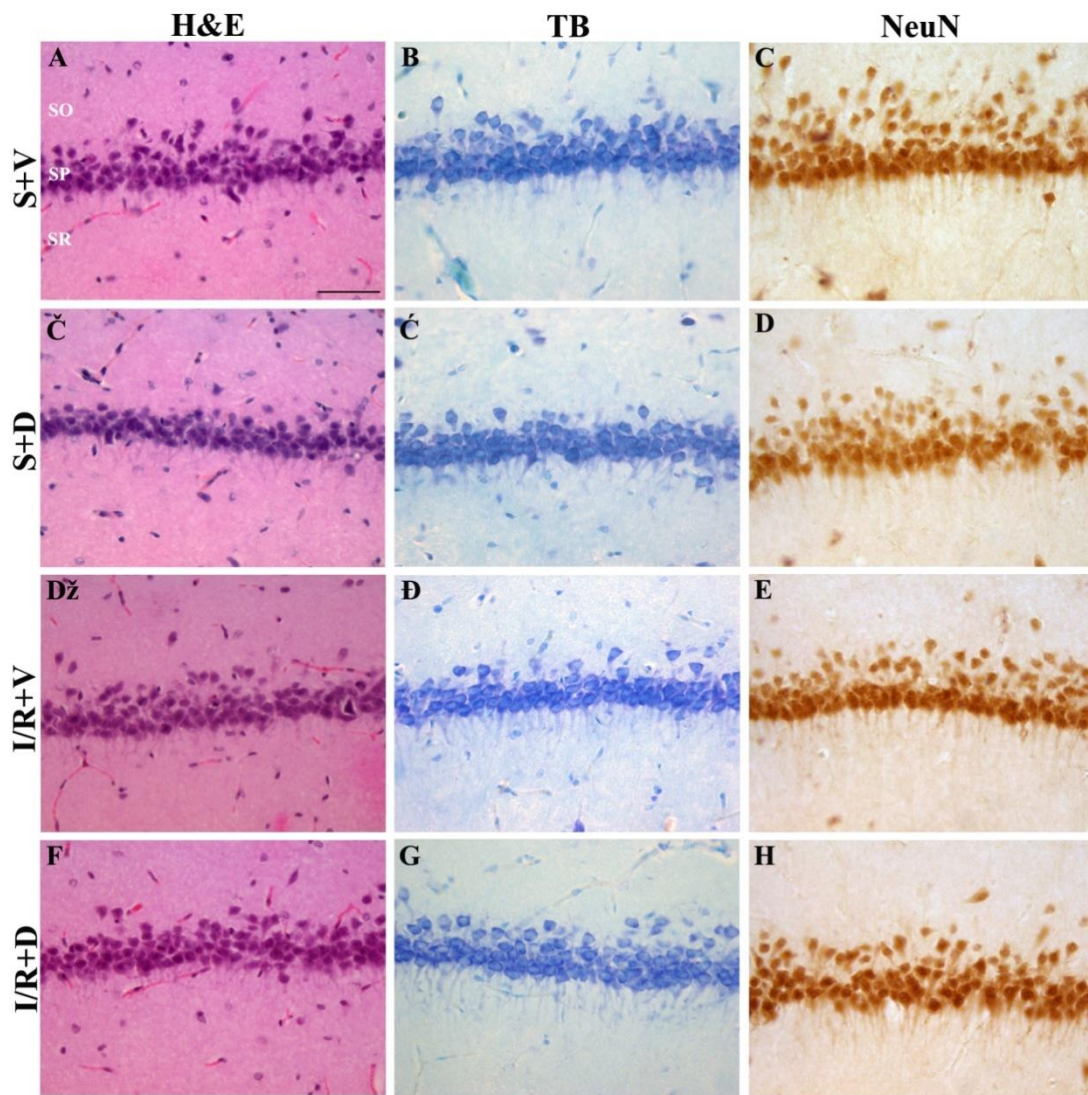
Slika 14. Reprezentativne mikrografije FJC bojenja hipokampusa (CA1 region) i prečeoone kore; n = 4 po grupi. Neurodegenerativne promene nisu uočene ni u jednoj eksperimentalnoj grupi kako u hipokampusu tako i u prečeojoj kori. Skala = 50  $\mu$ M. HIP- hipokampus; PFC- prečeoona kora.

## **Procena morfologije neurona u hipokampusu i prečenoj kori nakon kratkotrajne ishemije/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom**

Efekat kratkotrajne I/R i tretmana DHEA na morfologiju neurona procenjivan je pomoću H&E bojenja, Nisslovim TB bojenjem i imunohistohemijском analizom NeuN proteina.

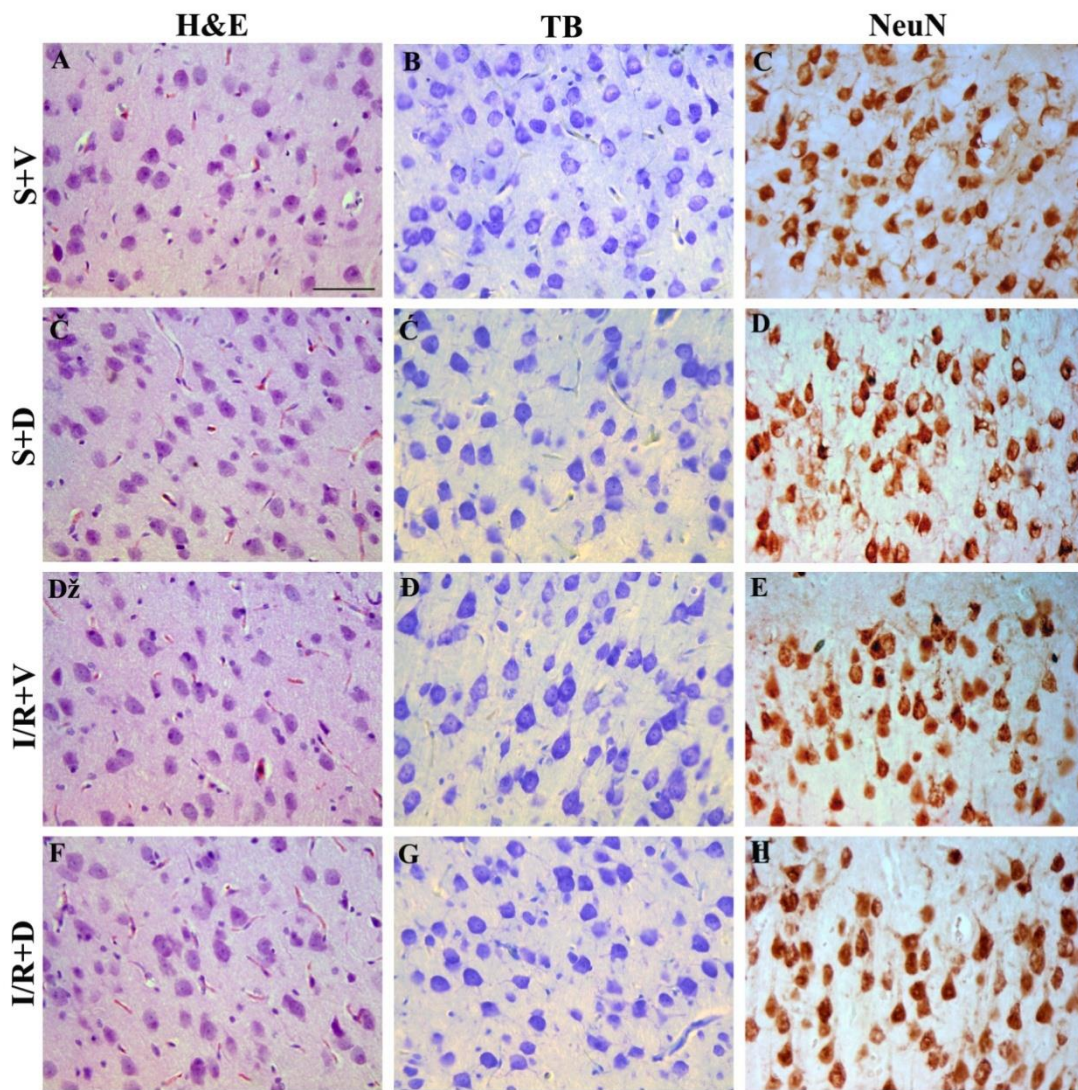
Primenjena histološka bojenja pokazala su neizmenjenu morfologiju neurona u obe moždane strukture svih eksperimentalnih grupa (Slika 15/16A, 15/16B, 15/16Č, 15/16Ć, 15/16Dž, 15/16Đ, 15/16F, 15/16G).

NeuN imunohistohemijска analiza pokazala je neizmenjenu ekspresiju NeuN proteina ukazujući na očuvanost integriteta neurona i odsustvo gubitka neurona u hipokampusu i prečenoj kori sve tri eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 15/16C, 15/16D, 15/16E, 15/16H).



Slika 15. Reprezentativne mikrografije H&E bojenja (levi panel), TB bojenja (središnji panel) i NeuN imunohistohemijske analize (desni panel) u CA1 regionu hipokampusa; n = 4 po grupi. Skala = 50  $\mu$ M (A-H). SO- stratum oriens, SP- stratum pyramidale; SR- stratum radians.





Slika 16. Reprezentativne mikrografije H&E bojenja (levi panel), TB bojenja (središnji panel) i NeuN imunohistohemijske analize (desni panel) prečone kore; n = 4 po grupi. Skala = 50  $\mu$ M (A-H).



## Efekat kratkotrajne ishemije/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom na nivo malondialdehida u homogenatu hipokampusa i prečone kore

S obzirom na to da je MDA jedan od završnih proizvoda peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina promene u njegovoj količini koriste se kao pouzdan pokazatelj povećane proizvodnje slobodnih radikala i peroksidacije lipida (Ayala i sar., 2014).

Nivo MDA, određivan u homogenatu tkiva, ostao je nepromenjen u hipokampusu i prečeonoj kori sve tri eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 2).

MDA (nmol/mg proteina)		
	hipokampus	prečeona kora
<b>S+V</b>	9.34 ± 0.81	5.67 ± 0.70
<b>S+D</b>	10.22 ± 0.61	5.20 ± 0.54
<b>I/R+V</b>	8.58 ± 0.51	5.50 ± 0.77
<b>I/R+D</b>	9.12 ± 0.43	5.29 ± 0.38

Tabela 2. Nivo MDA u homogenatu tkiva hipokampusa i prečone kore određivan TBA esejem; n = 5 po grupi. Vrednosti su izražavane kao srednja vrednost ± SEM. Postojanje statistički značajne razlike određivano je testovima two-way ANOVA i post hoc Tukey.

## Efekat kratkotrajne ishemije/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom na nivo redukovanog glutationa u frakciji citosola hipokampusa i prečone kore

GSH predstavlja jedan od najznačajnijih „redoks pufera“ u ćeliji i neizostavnu komponentu antioksidativne zaštite (Morgan, 2014). Analiza nivoa GSH u citosolnoj frakciji hipokampusa i prečone kore pokazala je odsustvo promene u sve tri eksperimentalne grupe u poređenju sa kontrolom (Tabela 3).

GSH (nmol/mg proteina)		
	hipokampus	prečona kora
<b>S+V</b>	154.1 ± 9.10	144.5 ± 9.24
<b>S+D</b>	145.6 ± 9.62	153.6 ± 21.01
<b>I/R+V</b>	153.8 ± 10.00	140.2 ± 10.76
<b>I/R+D</b>	152.9 ± 7.69	140.5 ± 8.06

*Tabela 3. Nivo GSH u frakciji citosola hipokampusa i prečone kore određivan Elmanovom metodom; n = 5 po grupi. Vrednosti su izražavane kao srednja vrednost ± SEM.*

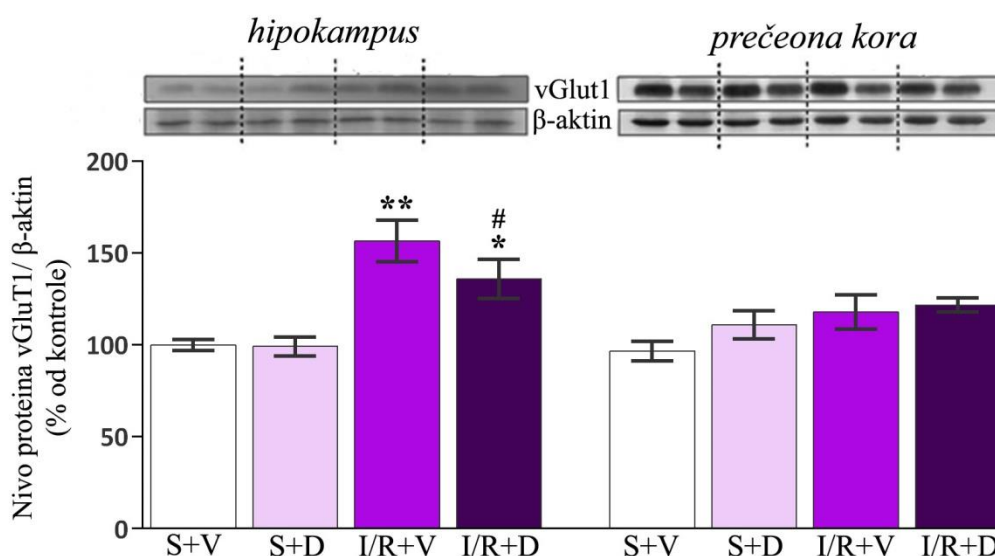
Postojanje statistički značajne razlike određivano je testovima two-way ANOVA i post hoc Tukey.

## **Efekat ishemije/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom na nivo proteina vGluT1 i komponente sinaptičkog kompleksa NMDA receptora**

### **Promene nivoa proteina vGluT1**

Potencijalne promene u neurotransmisiji posredovanoj glutatom, određivane su na osnovu procene nivoa vezikularnog glutamatnog transportera (engl. *vesicular glutamate transporter 1*- vGluT1). vGluT1 vrši transport glutamata u sinaptičke vezikule i široko je rasprostranjen u mozgu pacova (Vigneault i sar., 2015).

Statistička analiza dobijenih rezultata pokazala je značajan efekat I/R na nivo proteina vGluT1 u frakciji sinaptozoma hipokampusa ( $F_{1,16} = 31.24$ ,  $p < 0.0001$ ) i prečeoone kore ( $F_{1,14} = 5.35$ ,  $p < 0.05$ ). U hipokampusu nivo proteina vGluT1 bio je značajno povećan u I/R+V ( $p < 0.01$ ) i I/R+D grupi ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa kontrolom. Značajan porast zabeležen je i prilikom poređenja S+D i I/R+D grupe ( $p < 0.05$ ). Post hoc analiza nije pokazala statistički značajne promene nivoa proteina vGluT1 u prečeonoj kori (Slika 17).



Slika 17. Efekat kratkotrajne I/R i tretmana DHEA na nivo proteina vGluT1 određivan iz frakcije sinaptozoma hipokampusa i prečeaone kore; n = 5 po grupi. Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti ± SEM i izražavani kao procenti od kontrole (normalizovane u odnosu na OG traka dobijenih za β-aktin). Statistički značajne razlike određivane su testovima two-way ANOVA i post hoc Tukey. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu S+V grupu (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01) i S+D grupu (#p < 0.05).

## Promene proteinskog nivoa subjedinica kompleksa NMDA receptora

Budući da sastav i zastupljenost subjedinica NMDA receptora igraju važnu ulogu u fiziologiji CNS i patofiziologiji koja odlikuje moždanu I/R potencijalne promene nivoa proteina NR1, NR2A i NR2B praćene su u frakciji prečišćenih sinaptozoma.

### NR1

Two-way ANOVA pokazala je značajan efekat I/R na nivo proteina subjedinice NR1u hipokampusu ( $F_{1,14} = 26.29$ ,  $p < 0.001$ ) i prečeaonoj kori ( $F_{1,13} = 6.14$ ,  $p < 0.05$ ), kao i interakciju I/R × tretmana ( $F_{1,13} = 13.39$ ,  $p < 0.01$ ) u prečeaonoj kori. Porast nivoa hipokampalnog proteina NR1 zabeležen je u I/R+V ( $p < 0.05$ ) i I/R+D grupi ( $p < 0.01$ ) u poređenju sa S+V grupom kao i

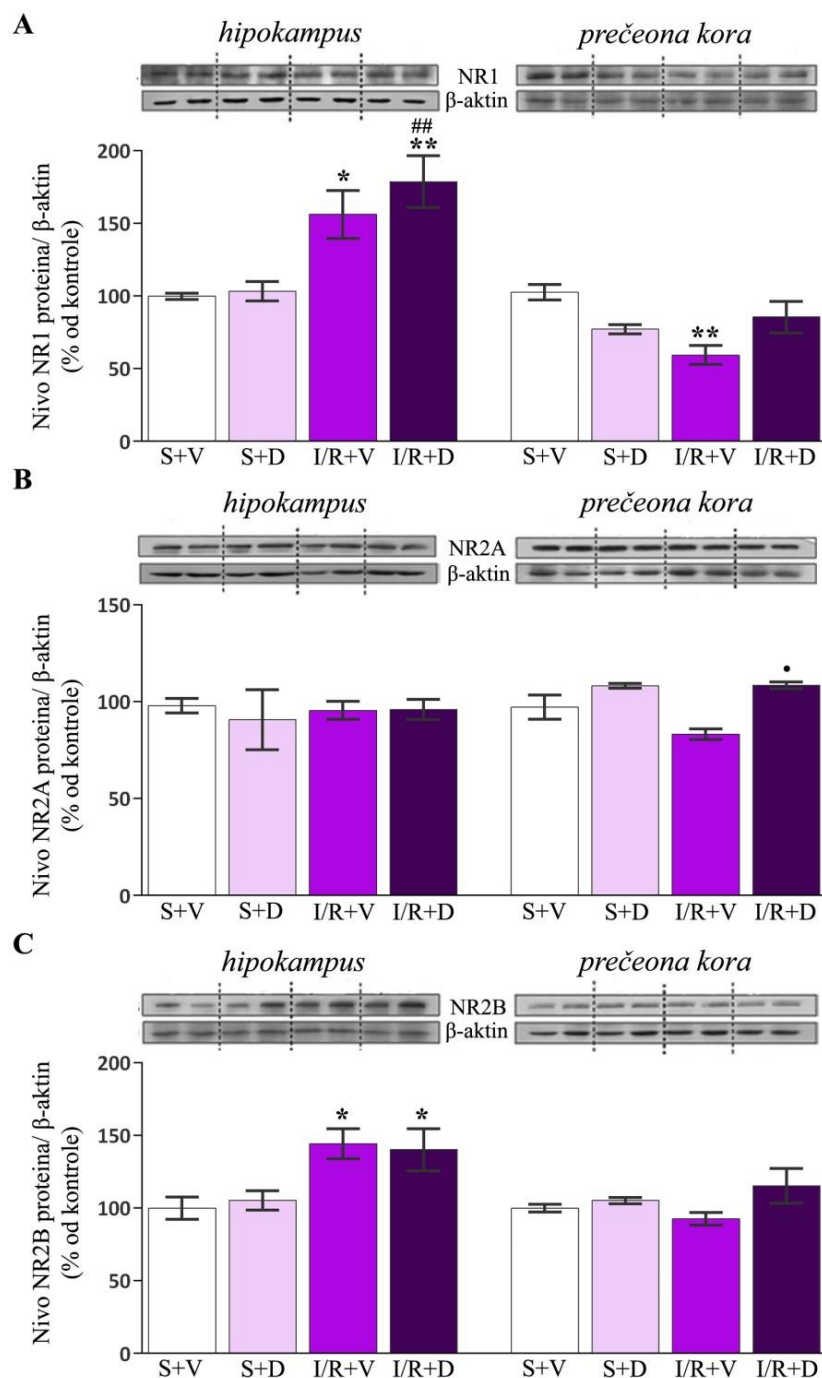
statistička značajnost prilikom poređenja S+D i I/R+D grupe ( $p < 0.01$ ). Nasuprot hipokampusu, nivo proteina NR1 u prečeonoj kori bio je niži u I/R+V grupi u poređenju sa kontrolom ( $p < 0.01$ ) (Slika 18A).

#### NR2A

Kratkotrajna I/R i tretman DHEA nisu imali statistički značajan efekat na proteinsku ekspresiju NR2A u hipokampusu. Nasuprot ovome, statistička analiza rezultata pokazala je značajan efekat tretmana ( $F_{1,15} = 11.31$ ,  $p < 0.01$ ) u prečeonoj kori i statistički značajno povećanje nivoa proteina NR2A u I/R+D grupi u poređenju sa I/R+V grupom ( $p < 0.01$ ) (Slika 18B).

#### NR2B

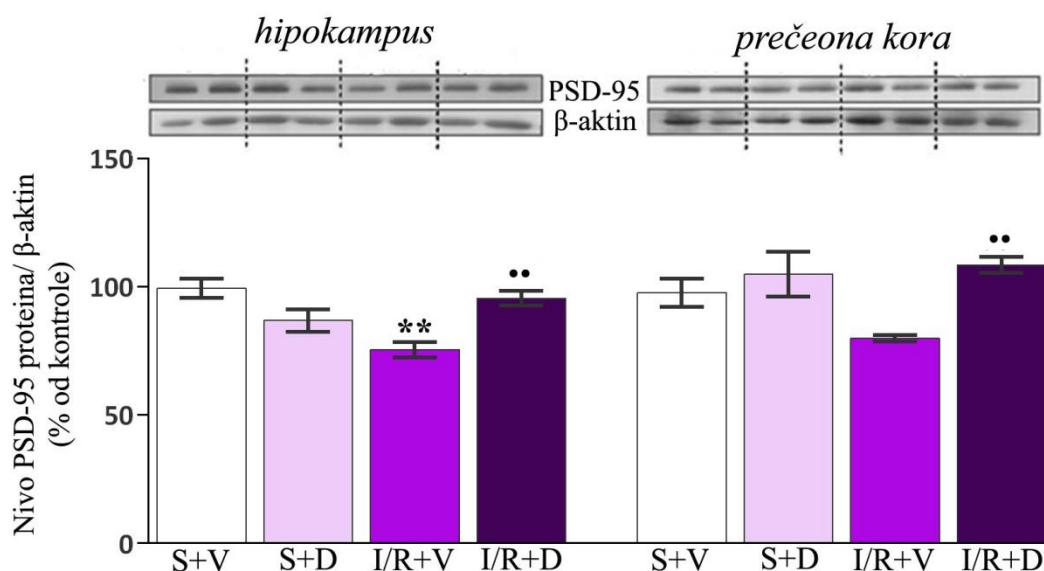
Analiza proteinskog nivoa NR2B subjedinice ukazala je na značajan efekat I/R ( $F_{1,14} = 16.62$ ,  $p < 0.01$ ) u hipokampusu praćen povećanjem količine proteina u I/R+V ( $p < 0.05$ ) i I/R+D ( $p < 0.05$ ) grupi u poređenju sa kontrolom. Za razliku od hipokampusa, two-way ANOVA pokazala je značajan efekat tretmana ( $F_{1,15} = 5.90$ ,  $p < 0.05$ ) u prečeonoj kori. Međutim, post hoc test nije pokazao statistički značajne razlike između ispitivanih grupa (Slika 18C).



Slika 18. Efekat kratkotrajne I/R i tretmana DHEA na nivo proteina NR1 (A), NR2A (B), NR2B (C) u frakciji sinaptozoma hipokampusa i prečeaone kore, n = 5 po grupi. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SEM i izražavani kao procenti od kontrole (normalizovane u odnosu na OG traka dobijenih za β-aktin). Statistički značajne razlike određivane su testovima two-way ANOVA i post hoc Tukey. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu S+V grupu (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01), S+D (##p < 0.01) i I/R+V grupu (p < 0.05).

### Promene nivoa proteina PSD-95

Statistička obrada podataka pokazala je značajan efekat I/R ( $F_{1,16} = 4.57$ ,  $p < 0.05$ ) i interakciju I/R×tretman ( $F_{1,16} = 20.87$ ,  $p < 0.001$ ) na nivo proteina PSD-95 u hipokampusu kao i značajan uticaj tretmana u prečeonoj kori ( $F_{1,14} = 11.90$ ,  $p < 0.01$ ). U hipokampusu proteinska ekspresija bila je značajno smanjena u I/R+V grupi ( $p < 0.01$ ) u poređenju sa kontrolom. Dodatno, pokazana je i značajna razlika između I/R+V i I/R+D grupe ( $p < 0.01$ ). Post hoc test je pokazao značajno povećanje nivoa proteina PSD-95 u prečeonoj kori isključivo u I/R+D grupi u poređenju sa I/R+V grupom ( $p < 0.01$ ) (Slika 19).



Slika 19. Efekat kratkotrajne I/R i tretmana DHEA na nivo proteina PSD-95 određivan u frakciji sinaptozoma hipokampusa i prečeone kore;  $n = 5$  po grupi. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM i izražavani kao procenti od kontrole (normalizovane u odnosu na OG traka dobijenih za  $\beta$ -aktin). Statistički značajne razlike određivane su testovima two-way ANOVA i post hoc Tukey. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu S+V grupu (\*\* $p < 0.01$ ) i I/R+V grupu (· $p < 0.01$ ).

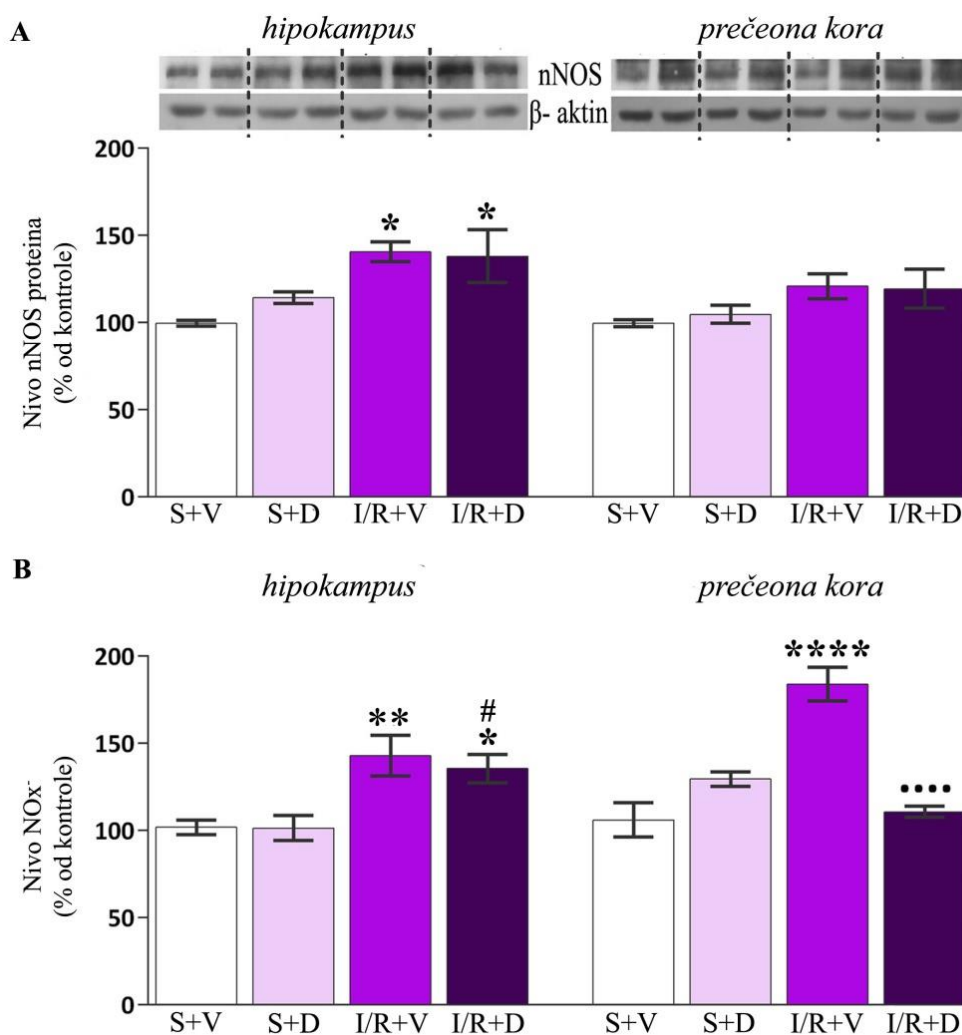
## **Efekat ishemije/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom na nivo proteina nNOS i NO u frakciji citosola hipokampusa i prečone kore**

Budući da nNOS i NO mogu biti blisko povezani sa oštećenjem koje karakteriše moždanu ishemiju (Chen i sar., 2017; Terpolilli i sar., 2012), kao i da DHEA može uticati na nivo NO (Barger i sar., 2000; Liu and Dillon, 2004; Simoncini i sar., 2003; Wang i sar., 2001), praćene su potencijalne promene njihove količine.

Dobijeni rezultati su pokazali značajan efekat I/R na nivo proteina nNOS u hipokampusu ( $F_{1,18} = 12.94$ ,  $p < 0.01$ ), gde je zabeleženo statistički značajno povećanje u I/R+V ( $p < 0.05$ ) i I/R+D grupi ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 20A). Analiza nivoa NO u hipokampusu pokazala je značajan efekat I/R ( $F_{1,18} = 22.97$ ,  $p < 0.001$ ) i povećanje u I/R+V ( $p < 0.01$ ) i I/R+D grupi ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom. Dodatno, pokazano je značajno povećanje nivoa NO u I/R+D ( $p < 0.05$ ) grupi u odnosu na S+D grupu (Slika 20B).

Za razliku od hipokampusa, oba faktora i njihova interakcija imali su značajan uticaj na nivo NO u prečenoj kori [I/R ( $F_{1,18} = 15.98$ ,  $p < 0.001$ ), tretman ( $F_{1,18} = 11.29$ ,  $p < 0.01$ ) i I/R×tretman ( $F_{1,18} = 42.82$ ,  $p < 0.0001$ )] (Slika 20B). Tukey test je pokazao značajno povećan nivo NO u I/R+V grupi ( $p < 0.0001$ ) u odnosu na kontrolnu. Interesantno je da je postoperativni tretman DHEA vratio nivo NO u I/R+D grupi na kontrolnu vrednost (I/R+V *vs* I/R+D,  $p < 0.0001$ ) (Slika 20B).

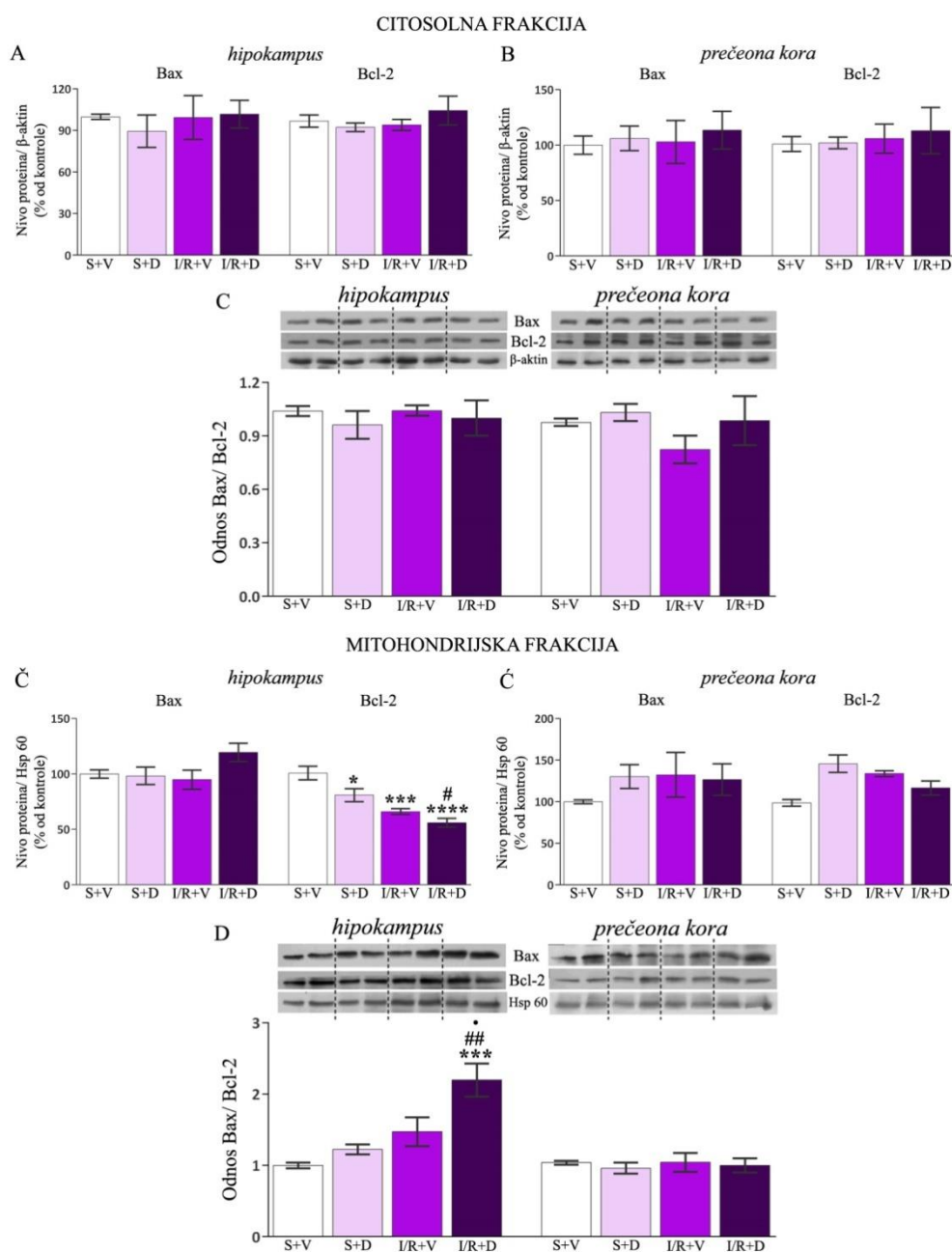




Slika 20. Efekat kratkotrajne I/R i tretmana DHEA na nivo proteina nNOS i nivo NO<sub>x</sub> određivan u frakciji citosola hipokampusa i prečione kore, n = 5 po grupi. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SEM i izražavani kao procenti od kontrole (i kod analize nNOS normalizovane u odnosu na OG traka dobijenih za β-aktin). Statistički značajne razlike određivane su testovima two- way ANOVA i post hoc Tukey. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu S+V grupu (\*p < 0.05, \*\*\*\*p < 0.0001), S+D grupu (#p < 0.05) i I/R+V grupu (---p < 0.001).

## **Efekat kratkotrajne ishemije/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom na nivo proteina Bax i Bcl-2 u citosolnoj i mitohondrijskoj frakciji hipokampusa i prečone kore**

Nivo Bax i Bcl-2, kao i njihov odnos (Bax/Bcl-2) ostao je nepromenjen u frakciji citosola hipokampusa i prečone kore sve tri eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolu (Slika 21A, 21B, 21C). Međutim, statistička analiza podataka pokazala je značajan efekat I/R ( $F_{1,16} = 37.48$ ,  $p < 0.0001$ ) i tretmana ( $F_{1,16} = 9.5$ ,  $p < 0.01$ ) na nivo Bcl-2 u mitohondrijskoj frakciji hipokampusa, kao i pad nivoa proteina u S+D ( $p < 0.05$ ), I/R+V ( $p < 0.001$ ) i I/R+D grupi ( $p < 0.0001$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 21Č). Dodatno, značajno manji nivo proteina zabeležen je u I/R+D grupi u poređenju sa S+D grupom ( $p < 0.05$ ) (Slika 21Č). Promene nivoa proteina Bax u mitohondrijskoj frakciji hipokampusa nisu zabeležene ni u jednoj od tri ispitivane grupe u poređenju sa kontrolom. Detektovane promene nivoa Bcl-2 odrazile su se i na odnos Bax/Bcl-2 u mitohondrijskoj frakciji hipokampusa, te je primećen značajan efekat I/R ( $F_{1,16} = 20.75$ ,  $p < 0.001$ ) i tretmana ( $F_{1,16} = 8.870$ ,  $p < 0.01$ ) (Slika 21D). Iako je povećan odnos Bax/Bcl-2 zabeležen u I/R+V grupi, post hoc test je pokazao statistički značajan porast isključivo u I/R+D grupi u poređenju, kako sa kontrolom ( $p < 0.001$ ), tako i sa S+D ( $p < 0.01$ ) i I/R+V ( $p < 0.05$ ) grupom (Slika 21D). Promene nivoa proteina i njihovog odnosa nisu uočene u prečonej kori nijedne ispitivane grupe u poređenju sa kontrolom (21Č, 21Ć, 21D).

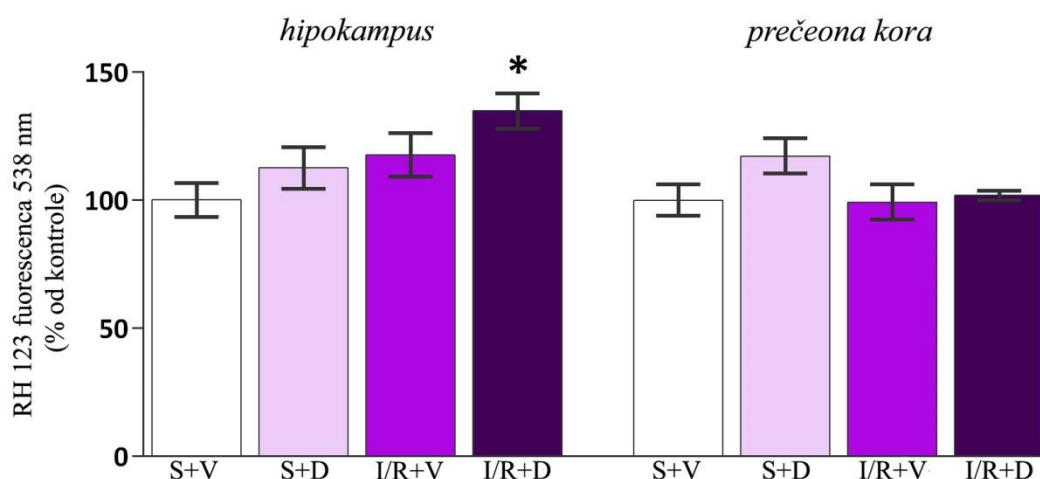


Slika 21 Efekat kratkotrajne I/R i tretmana DHEA na nivo proteina Bax, Bcl-2 i njihov odnos (Bax/Bcl-2) određivan u frakciji citosola i mitohondrija hipokampusa i prečeaone kore; n = 5 po grupi. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM i izražavani kao procenti od kontrole (normalizovane u odnosu na OG traka dobijenih za  $\beta$ -aktin odnosno Hsp-60). Statistički značajne razlike određivane su testovima two-way ANOVA i post hoc Tukey. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu S+V grupu (\*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 \*\*\*\*p < 0.0001), S+D grupu (#p < 0.05, ##p < 0.01) i I/R+V grupu (p < 0.05).

## Efekat kratkotrajne ishemiје/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom na potencijal membrane mitohondrija u ćelijama hipokampusa i prećeone kore

$\Delta\Psi_m$  predstavlja izuzetno dobar pokazatelj energetskog statusa mitohondrija i njegove promene najćeće bivaju štetne po homeostazu ćelije (Beltran i sar., 2000).

Statistićka analiza rezultata pokazala je znaćajan efekat I/R ( $F_{1, 18} = 6.485$ ,  $p < 0.05$ ) na fluorescenciju RH 123 u hipokampusu i povećanje iste iskljućivo u I/R+D grupi ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa kontrolom (Slika 22) ukazujući na narušavanje  $\Delta\Psi_m$ . Promene fluorescencije RH 123 nisu uoćene u prećeonoj kori nijedne ispitivane grupe u poređenju sa kontrolom (Slika 22).



Slika 22. Efekat kratkotrajne I/R i tretmana DHEA na potencijal mitohondrijske membrane intaktnih mitohondrija hipokampusa i prećeone kore,  $n = 5$  po grupi. Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM i izraćavani kao procenti od kontrole. Statistićki znaćajne razlike odrećivane su testovima two-way ANOVA i post hoc Tukey. Simbol oznaćava statistićki znaćajnu razliku u odnosu na kontrolnu S+V grupu ( $*p < 0.05$ ).

# **DISKUSIJA**

## Opravdanost korišćenog I/R modela za proučavanje promena koje karakterišu tranzitorni ishemijski atak

Važeća, do danas prihvaćena definicija, karakteriše TIA kao prolaznu epizodu neurološke disfunkcije uzrokovanu fokalnom ishemijom mozga, kičmene moždine ili retine, bez akutnog infarkta u trajanju do 60 min (Easton i sar., 2009). Ako se uzme u obzir da definicija ističe značaj fokalne opstrukcije krvotoka, nameće se razumno pitanje o opravdanosti korišćenja okluzije zajedničkih karotidnih arterija kao relevantnog modela za proučavanje promena izazvanih TIA, budući da se model koji osigurava fokalnu opstrukciju krvotoka može činiti podesnijim.

Privremena okluzija zajedničkih karotidnih arterija predstavlja model nepotpune globalne moždane ishemije i kao takav relevantan je za istraživanje patofizioloških mehanizama karakterističnih za srčani zastoj ili nasilni prekid dotoka krvi. Međutim, bitno je istaći da osim navedenog postoji značajna povezanost ovog modela sa TIA. Naime, jednostrana/obostrana okluzija karotidnih arterija kod ljudi može dovesti do TIA, te neretko ona predstavlja upozoravajući signal koji otkriva postojanje dubljeg problema nakon čega se pacijenti šalju na karotidnu endarterektomiju čime se sprečavaju dalje komplikacije i smrtni ishod (Schroeder i sar., 1986; Lai i sar., 2005; Kavakli i sar., 2015). Dodatno, iako se modeli fokalne moždane ishemije (poput MCAO), najčešće koriste u istraživanjima, treba imati u vidu sledeće činjenice koje su razmatrane prilikom izbora između MCAO i modela primenjenog u ovoj doktorskoj disertaciji: 1) prilikom MCAO procedure proksimalna okluzija krvnih sudova često uzrokuje pojavu edema i intrakranijalnu hipertenziju, te izaziva neželjenu povredu mozga; 2) distalne vaskularne okluzije podrazumevaju kraniektomiju koja je vrlo invazivna metoda i predstavlja snažan stresor. Štaviše, ona nosi ozbiljne neželjene efekte kao što su subarahnoidalno krvarenje, infekcija i gubitak cerebrospinalne tečnosti (Bacigaluppi i sar., 2010).

Navedeni faktori mogu ozbiljno ugroziti valjanost samog modela, te se nameće pitanje da li je oštećenje koje se uočava u ovim modelima zapravo posledica I/R ili rezultat navedenih neželjenih efekata hirurške procedure. S druge strane, hirurška procedura modela koji je korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji „zaobilazi mozak“ i ne može izazvati pomenute neželjene efekte.

Odsustvo senzo-motornih deficita i infarktne lezija upotrebom MRI (engl. *magnetic resonance imaging*) 24 sata nakon ishemične povrede su neophodni uslovi kako bi određeni model bio okarakterisan kao podesan, klinički značajan model za TIA (Pedrono i sar., 2010; Durukan Tolvanen i sar., 2017). Iako ova doktorska disertacija ne uključuje MRI snimanje, očuvana senzo-motorna funkcija životinja i odsustvo infarktne lezija daju verodostojan dokaz da se 15 min I/24 sata R zajedničkih karotidnih arterija može koristiti kao model relevantan za proučavanje stanja nalik TIA. Dodatno, izostanak neurodegenerativnih promena u hipokampusu i prečenoj kori dodatno potvrđuju relevantnost modela u pogledu izučavanja molekulskih promena koje karakterišu TIA.

**Histološka i imunohistohemijska analiza nakon  
kratkotrajne ishemije/reperfuzije i tretmana  
dehidroepiandrosteronom- relevantnost dobijenih  
podataka u proceni patofiziologije tranzitornog  
ishemijskog ataka**

Histološka analiza nije pokazala znake aberantne morfologije 24 sata nakon ishemične povrede i primenjenog tretmana. NeuN imunohistohemijska analiza pokazala je očuvanu imunoreaktivnost proteina u obe istraživane strukture u svim eksperimentalnim grupama. Ukoliko se pretpostavi da je korišćeni model relevantan za ispitivanje promena koje odlikuju TIA ovi rezultati mogu predstavljati dragocen podatak budući da su histopatološke studije na pacijentima u potpunosti neprihvatljive iz etičkih i moralnih razloga. Eksperimentalna istraživanja na životinjskim modelima do sada se nisu bavila navedenim aspektom te bi odsustvo promena na histo/morfološkom nivou moglo predstavljati dodatni „uslov“ za razmatranje prilikom izbora modela za TIA.



## Odsustvo promena nivoa malondialdehida i redukovanog glutationa nakon ishemije/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom

Procena nivoa MDA i GSH zauzima značajno mesto u istraživanjima koja se bave moždanom I/R. Usled velike zastupljenosti poli-nezasićenih masnih kiselina, membrane nervnih ćelija su veoma osetljive na oksidativni stres te često bivaju „meta“ lipidne peroksidacije (Chen i sar., 2008; Shichiri, 2014). Sa druge strane, GSH omogućava uklanjanje vodonika i lipidnih peroksida te predstavlja jedan od najznačajnijih antioksidativnih sistema zaštite mozga (Coyle i Puttfarcken, 1993; Bhandari i Ansari, 2008).

Rezultati nisu pokazali promenu nivoa MDA i GSH u hipokampusu i prečenoj kori životinja ni u jednoj od tri eksperimentalne grupe u poređenju sa kontrolom. Ovo je u suprotnosti sa rezultatima mnogobrojnih studija koje su pokazale povećanu lipidnu peroksidaciju (Bhandari i Ansari, 2008; Schimidt i sar.; 2014, Li i sar., 2017; Ren i sar., 2017; Wicha i sar., 2017) i smanjenje GSH nakon ishemije (Bhandari i Ansari, 2008; Schimidt i sar., 2014; Yaidikar i sar., 2014). Kada se govori o efektima DHEA, oskudni eksperimentalni podaci pokazali su delotvornost u pogledu postishemičnog povećanja MDA i pada GSH (Aragano, 2000), dok *in vivo* delovanje u fiziološkim uslovima nije okarakterisano. Neusaglašenost rezultata može biti objašnjena upotrebom različitih I/R modela. Naime, iako su modeli u navedenim studijama naizgled slični modelu koji je opisan u ovoj doktorskoj disertaciji, oni se razlikuju po tipu krvnih sudova koji su bili podvrgnuti okulziji, trajanju faze ishemije i/ili reperfuzije i vrste/soja koji mogu značajno uticati na ispitivane parametre. Treba uzeti u obzir da, iako na prvi pogled paradoksalno, uočeni postishemični porast NO može zaustaviti ciklus propagacije lipidne peroksidacije budući da NO u reakciji sa alkoksi i peroksi radikalima može neutralisati njihove štetne intermedijere (Warner i sar., 2004). Dodatno, iako dobijeni rezultati mogu ukazati na nedostatak oksidativnog stresa nakon I/R i tretmana DHEA,

moguće je da trajanje primenjene reperfuzije (24 sata) predstavlja odgovarajući period za efikasno uklanjanje slobodnih radikala (engl. *free radicals washing phenomenon*) nakon 15 min ishemije (Nita i sar., 2001).

## **Promene nivoa proteina vGluT1 i komponenti kompleksa NMDA receptora nakon kratkotrajne ishemije/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom**

Promene količine glutamata u sinaptičkoj pukotini i nishodnoj signalizaciji posredovanoj membranskim receptorima za koje se vezuje izrazito su značajni tokom nastanka patofiziologije koja karakteriše moždanu ishemiju (Choi, 1988; Lai i sar., 2011). Glutamat se u presinaptičkim dugmićima sintetise iz glutamina i čuva se u lumenu sinaptičkih vezikula (Benarroch, 2010). vGluT1 učestvuje u transportu glutamata iz citosola u sinaptičke vezikule (Benarroch, 2010), čime posredno omogućava povećanje ovog neurotransmitera u sinaptičkoj pukotini. Analiza proteina vGluT1 u sinaptozomima hipokampusa pokazala je porast u obe ishemične grupe, što je u skladu sa literaturnim podacima koji svedoče u prilog postishemičnog povećanja vGluT1 u hipokampusu (Epsztein i sar., 2006; Llorente i sar., 2013). Dobijeni rezultat može ukazati na pojačano skladištenje glutamata u sinaptičkim vezikulama, što za posledicu može imati povećanje količine ovog neurotransmitera u sinaptičkoj pukotini i prekomernu aktivaciju glutamatnih receptora u hipokampusu i pojavu neurotoksičnosti.

Budući da je hipokampus izuzetno osetljiv na delovanje različitih stresora (Conrad, 2008), mnogobrojne studije su se bavile proučavanjem I/R-posredovanih promena proteina u sastavu kompleksa NMDA receptora upravo u ovoj moždanoj strukturi (Heurteaux i sar., 1994; Zhang i sar., 1997; Hsu i sar., 1998; Liu i sar., 2010; He i sar., 2014; Han i sar., 2016). Uprkos ovome, jedinstven zaključak o prirodi promena proteina u sastavu NMDA receptora tokom i nakon I/R nije donesen budući da su u različitim studijama prijavljivani

oprečni podaci (Heurteaux i sar., 1994; Zhang i sar., 1997; Hsu i sar., 1998; Liu i sar., 2010; He i sar., 2014; Han i sar., 2016). Jedno od mogućih objašnjenja za navedenu nekonzistentnost rezultata može biti tip korišćenog I/R modela kao i izbor analiziranog regiona hipokampusa odnosno sloja prečeeone kore. Stoga je neophodno naglasiti da je u ovoj doktorskoj disertaciji ispitivanje vršeno na sinaptozomima ukupnog homogenata tkiva hipokampusa i prečeeone kore koji se sastoji samo od neizmenjenih sinaptičkih kontakata, te se uočene gore navedene razlike, kao i one opisane u ostatku diskusije, odnose isključivo na rearanžmane u okviru vijabilnih sinapsi, a prisustvo promena ne može biti sa sigurnošću povezano sa određenim regionom hipokampusa odnosno slojem prečeeone kore.

Analiza nivoa proteina u sastavu kompleksa NMDA receptora pokazala je povećanje nivoa subjedinica NR1 i NR2B i smanjenje PSD-95 u hipokampusu životinja podvrgnutih I/R. S obzirom na to da je aktivnost i funkcija NMDA receptora određena nivoom ekspresije i tipom NR1/NR2 heterooligomera na sinaptičkoj membrani (Gascon i sar., 2005), uočeno povećanje nivoa sinaptičkih NR1 i NR2B može ostvariti značajan efekat na aktivnost receptora. Sa druge strane, bilo bi očekivano da promene nivoa PSD-95 prate uočeno povećanje nivoa subjedinica NMDA receptora posebno konstitutivno eksprimirane NR1. Naime, ukoliko se pretpostavi da uočeni postishemični porast NR1 subjedinice ukazuje na potencijalno povećanje broja sinaptičkih NMDA receptora u hipokampusu, očekivalo bi se i povećanje PSD-95, uzimajući u obzir da je on neophodan za ukotvljavanje i pozicioniranje komponenti NMDA receptora kao i nishodnu signalizaciju. Međutim, analiza sinaptičkog proteina PSD-95 pokazala je pad u hipokampusu netretiranih ishemičnih životinja. Iako na prvi pogled paradoksalno, uzrok ovakve promene može predstavljati upravo prekomerna aktivacija postojećih NMDA receptora nakon I/R. Naime, Sturgill i saradnici (2009) su, primenivši kratak tretman NMDA na presecima hipokampusa, uočili da aktivacija NMDA receptora uzrokuje destabilizaciju PSD-95 i dovodi do brzog smanjenja proteina PSD-95 prethodno usidrenih u

dendritskim trničima. Na sličan način bi se mogao objasniti i gubitak PSD-95 ukotvljenih u postsinaptičku membranu nakon prekomerne postishemične aktivacije NMDA receptora. Drugi mehanizam koji bi mogao pružiti objašnjenje odnosi se na smanjenje PSD-95 u postsinaptičkoj membrani nakon povećanja unutarćelijskog  $Ca^{2+}$  izazvanog povećanom aktivacijom glutamatnih receptora. Porast  $Ca^{2+}$  posredno utiče na aktivaciju kalpaina koji mogu izvršiti isecanje proteina pridruženih sinaptičkoj membrani te time mogu promeniti strukturu postsinaptičke membrane i količinu proteina PSD-95 (Vinade i sar., 2001; Gascon i sar., 2008). Važno je napomenuti, da osim što PSD-95 ima značajnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti, promene nivoa ovog proteina su izrazito važne za uspostavljanje i održavanje signalne transdukcije nishodno od NMDA receptora, te bi gubitak istog mogao kompromitovati transdukciju signala u postsinaptičkim neuronima.

Nasuprot hipokampusu, ekspresija vGluT1 i proteina NMDA receptorskog kompleksa nakon I/R slabo je istraživana u prečeonoj kori (Lu i sar., 2004; Dos-Anjos i sar., 2009; Cervantes i sar., 2013). U ovoj doktorskoj disertaciji uočene su region-specifične postishemične promene prilikom analize proteina vGluT1 i PSD-95, te u prečeonoj kori ishemičnih životinja, za razliku od hipokampusa, nisu pokazane promene ovih proteina.

Jedina zapažena promena proteina koji ulaze u sastav kompleksa NMDA receptora u prečeonoj kori jeste smanjenje nivoa subjedinice NR1, dok su NR2A i NR2B ostale nepromenjene. Dobijeni rezultat je u skladu sa prethodno objavljenim podatakom da moždana ishemija može dovesti do negativne regulacije NR1 iRNK u početnoj fazi reperfuzije što za posledicu može imati smanjenje nivoa proteina NR1 (Gascon i sar., 2005). Interesantan je podatak Fukaya i saradnika (2003) koji navode da je NR1 subjedinica od izrazitog značaja za unutarćelijsko deponovanje NR2 subjedinica, budući da je kod knock-out miševa za gen NR1 onemogućeno oslobađanje nosivih molekula NR2 iz cisterni endoplazminog retikuluma. S obzirom da je NR1 subjedinica NMDA receptora konstitutivno eksprimirana, bilo kakva promena

njene ekspresije najčešće ostvaruje značajan efekat na funkciju receptora (Gascon i sar., 2005). Naposljetku, postishemično smanjenje NR1 subjedinice i odsustvo promene NR2B i vGLUT1 u prečeonoj kori može ukazivati na potencijalno odsustvo neurotoksičnosti posredovane NR2B-NMDA receptorom.

Kompleks NMDA receptora nije predmet samo bazičnih istraživanja moždane ishemije, već i studija koje se tiču farmakoterapije. Naime, iako su različiti antagonisti NMDA receptora korišćeni kao potencijalni terapeutici ishemičnih stanja, svaki od njih pokazao je negativne neželjene efekte ili neefikasnost u pre(kliničkim) studijama. Budući da DHEA deluje na različite receptore u mozgu značajne za razvoj postishemične patofiziologije i fiziološki je prisutan u ljudskom telu (Maninger i sar., 2009) postoji indicija za njegovu primenu u terapiji stanja koja su uzrokovana moždanom ishemijom.

DHEA deluje kao pozitivan alosterični modulator NMDA receptora i dosadašnje studije su pokazale oprečne podatke, odnosno njegov neuroprotektivan efekat blokiranjem neurotoksičnosti karakteristične za I/R (Cardounel i sar., 1999; Kimonides i sar., 1998; Maurice i sar., 2006; Kaasik i sar., 2003; Kurata i sar., 2004) ali i neurotoksičnost (Kimonides i sar., 1999; Safiulina i sar., 2006; Gil-Ad i sar., 2001). Dodatno, istraživanja su pokazala da su vreme i doza ključni faktori koji određuju prirodu DHEA efekta (Maninger i sar., 2009; Lin i sar., 2004). Li i saradnici (2009) su pokazali da je jednokratna primena DHEA (20 mg/kg) 3 do 48 sati nakon I/R imala neuroprotektivne efekte kao što su smanjenje smrti neurona u CA1 regionu hipokampusa i poboljšanje kognitivnih deficita kod pacova. Nasuprot tome, DHEA tretman 1 sat pre ili posle ishemije pokazao se kao neurotoksičan pogoršavajući stepen neuronske smrti i kognitivne deficite (Li i sar., 2009).

Dobijeni rezultati pokazali su da primenjeni tretman DHEA ne utiče na nivo vGluT1, kao ni sastav sinaptičkih subjedinica NMDA receptora i nivo PSD-95 u hipokampusu i prečeonoj kori lažno operisanih životinja. Ovi podaci predstavljaju značajan doprinos razumevanju delovanja DHEA budući da ne

postoje podaci o efektima ovog neurosteroida na ekspresiju navedenih proteina u fiziološkim uslovima.

Primena tretmana DHEA 4 sata nakon ishemične povrede ostvarila je diskretne efekte posmatrajući nivo ispitivanih proteina u sastavu kompleksa NMDA receptora. Naime, nivo hipokampalnog PSD-95 vraćen je na kontrolnu vrednost nakon tretmana kod životinja podvrgnutih I/R. Takođe, promene nivoa proteina NR1 u prečeonoj kori ishemičnih životinja tretiranih DMSO nisu uočene u grupi tretiranoj DHEA gde je količina proteina vraćena na kontrolni nivo. Ovi rezultati ukazuju na potencijalni postishemični neuromodulatorni efekat DHEA, te ovi podaci mogu biti značajni u pogledu farmakoterapije.

## **Promene nNOS i NO nakon kratkotrajne ishemije/reperfuzije i tretmana dehidroepiandrosteronom**

Istraživanja na životinjskim I/R modelima pokazala su da narušavanje krvotoka u mozgu uzrokuje naglo smanjenje NO i masivan porast istog nakon ponovnog uspostavljanja cirkulacije (Chen i sar., 2017b). U skladu sa navedenim su i rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji koji ukazuju na postishemični porast nivoa proteina nNOS i NO u hipokampusu obe ishemične grupe. Dosadašnji literaturni podaci pokazuju da je rano postishemično povećanje NO uglavnom proizvod delovanja nNOS koji biva aktiviran prvenstveno usled pojačane aktivnosti NMDA receptora, odnosno mehanizmom postishemične neurotoksičnosti posredovane NMDA receptorom (Zhou i Zhu, 2009; Lai i sar., 2011; Zhou i Sheng, 2013; Chen i sar., 2017b). Promene sastava sinaptičkih subjedinica NMDA receptora mogu značajno uticati na proizvodnju NO, pri čemu se ističe značaj NR2B subjedinice u regulaciji fosforilacije nNOS (Hisatsune i sar., 1999; Rameau i sar., 2004; Robison i sar., 2005; Waxman i Lynch, 2005). Naime, Ca<sup>2+</sup> kalmodulin zavisna kinaza II može vršiti fosforilaciju Ser<sub>847</sub> nNOS time utičući na regulaciju njene aktivnosti (Rameau i sar., 2004). Ova kinaza vezuje se za CTD subjedinice NR2B (Robison i

sar., 2005) u blizini nNOS koji interaguje sa PSD-95 (Lai i sar., 2011). Dodatno, fosfatidilinozitol-3 kinaza se vezuje za jedan od prethodno fosforilisanih Tyr NR2B subjedinice dovodeći do fosforilacije fosfoinozitida, regrutovanja i aktivacije Akt kinaze na sinaptičkoj membrani, koja dalje može fosforilisati nNOS (Hisatsune i sar., 1999; Waxman i Lynch, 2005). U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano povećanje vGluT1, kao i sinaptičkih subjedinica NR1 i NR2B u hipokampusu ishemičnih životinja što može ukazati na prekomernu aktivaciju NR2B-NMDA receptora i pokretanja navedenih nishodnih puteva. U svetlu svih dobijenih rezultata i uočenog smanjenja nivoa PSD-95, moguće je da i diskretan nivo sinaptičkog PSD-95 uspešno ostvaruje ulogu sponse u signalnoj transdukciji posredovanoj NR2B-NMDA receptorom, te da količina ovog proteina nije potencijalno presudna odnosno ograničavajuća za prenos signala.

Nasuprot hipokampusu, u prečonoj kori nije pokazana promena nivoa nNOS proteina dok je nivo NO bio značajno povećan. Moguće je da je uočeno povećanje NO regulisano putem koji je nezavisan od neurotoksičnosti posredovane NMDA receptorom. Eksperimentima nije obuhvaćena analiza eNOS i iNOS koja bi mogla biti značajna za objašnjenje porasta NO u prečonoj kori. Naime, porast nivoa NO tokom akutne faze reperfuzije se uglavnom označava kao neurotoksičan i on predstavlja prevashodno proizvod delovanja nNOS, a zatim i iNOS (Chen i sar., 2017), dok NO proizveden delovanjem eNOS može imati neuroprotektivne efekte.

U ovoj doktorskoj disertaciji je po prvi put pružen uvid u delovanje DHEA na nivo proteina nNOS u fiziološkim i ishemičnim uslovima *in vivo*. Malobrojne *in vitro* studije, proučavale su efekte DHEA na ekspresiju i aktivnost iNOS (Barger i sar., 2000; Wang i sar., 2001) i eNOS (Simoncini i sar., 2003; Liu i Dillon, 2004), ali ne i nNOS. DHEA nije imao efekat kako u fiziološkim uslovima tako i na I/R-posredovane promene nivoa nNOS i NO u hipokampusu. Međutim, interesantno je da u prečonoj kori DHEA-tretiranih ishemičnih životinja nivo NO vraćen na kontrolni što upućuje na potencijalni region-specifični mehanizam regulacije nNOS/NO sistema. Porast NO u

prečeonoj kori može biti proizvod aktivnosti iNOS, obzirom da je DHEA-posredovana negativna regulacija genske i proteinske ekspresije iNOS, kao i inhibicija proizvodnje nitrata prethodno okarakterisana (Barger i sar., 2000; Wang i sar., 2001). Moglo bi se zaključiti da DHEA u ishemičnim uslovima, ali ne i fiziološkim, potencijalno utiče na nivo NO putem regulacije ekspresije iNOS.

Toksični efekti koje bi moglo ostvariti povećanje NO proizvedenog delovanjem nNOS (i iNOS) uglavnom su posledica prekomerne proizvodnje nitrata i stvaranja slobodnih radikala (Chen i sar., 2017b), koji direktno mogu oštetiti enzime odgovorne za mitohondrijsku respiraciju, glikolizu i replikaciju DNK (Moro i sar., 2005; Awooda i sar., 2013). Sa druge strane, nepromenjeni nivoi MDA i GSH ukazali su na potencijalno odsustvo stanja oksidativnog stresa, što značajno smanjuje verovatnoću proizvodnje RNS. Međutim, ne treba zaboraviti da uočeni porast NO može ostvariti direktne štetne efekte putem neposredne nitrozilacije različitih proteina u ćeliji narušavajući na taj način njihovu strukturu i funkciju (Shahani i Sawa, 2012).

## **Region-specifične promene pro-apoptotske signalizacije u ishemičnoj grupi tretiranoj dehidroepiandrosteronom**

Da bi se razumeo biološki značaj dobijenih rezultata neophodno je analizirati delovanje Bax i Bcl-2 na nivou mitohondrijske membrane (MM). Vezujući se za monomere Bax umetnute u MM, anti-apoptotski Bcl-2 deluje kao značajan inhibitor štetne oligomerizacije Bax i povećane propustljivosti MM, čime se sprečava pokretanje pro-apoptotske kaskade i ćelijska smrt (Dlugosz i sar., 2006). Bitno je istaći da je odnos Bax/Bcl-2 prognostički relevantniji za preživljavanje odnosno ulazak ćelije u apoptozu (Raisova i sar., 2001), u poređenju sa *per se* procenom nivoa proteina Bax i Bcl-2.

Ova studija je otkrila smanjeni nivo proteina Bcl-2 u mitohondrijama hipokampusa sve tri eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolu, što je u



skladu sa prethodno prijavljenim podacima u izolovanim mitohondrijama kardiomiocita nakon ishemije (Chen i Lesnefsky, 2011; Chen i sar., 2015). Promene nivoa Bax nisu uočene što je rezultovalo statistički značajnim povećanjem mitohondrijskog odnosa Bax/Bcl-2 u hipokampusu ishemičnih životinja tretiranih DHEA. Navedene promene odnosa Bax/Bcl-2 praćene su smanjenjem  $\Delta\Psi_m$  u hipokampusu DHEA-tretiranih ishemičnih pacova.

Uočene promene parametara pro-/anti-apoptotske signalizacije u hipokampusu DHEA-tretirane ishemične grupe ukazuju na potencijalno štetan efekat ovog neurosteroida nakon I/R. Prikazani rezultati su u skladu sa prethodnim studijama koje su ukazale na štetne efekte ovog neurosteroida na funkciju mitohondrija budući da je okarakterisana DHEA-posredovana inhibicija kompleksa I mitohondrijskog respiratornog lanca (Safiulina i sar., 2006), kao i neurotoksični *in vitro* i *in vivo* efekti (Gil-ad i sar., 2001; Safiulina i sar., 2006). Moguće je da efekat DHEA nije sam po sebi štetan, već da njegova primena 4 sata nakon I/R pogoršava već narušenu homeostazu mitohondrija što je u saglasnosti sa utvrđenom činjenicom da vreme i doza DHEA predstavljaju veoma važne faktore koji određuju njegovu efikasnost (Li i sar., 2009; Maninger i sar., 2009).

Iako je prvobitno označen kao verodostojan i neizostavni pokazatelj pro-apoptotskih dešavanja u ćeliji (Zamzami i sar., 1995; Cohen. 1997), danas je poznato da kolaps  $\Delta\Psi_m$  nije neophodan događaj prilikom apoptoze (Ly i sar., 2003). Još uvek ostaje upitno da li se narušavanje  $\Delta\Psi_m$  javlja kao pokretač ili kao efekat već pokrenute apoptoze i da li je zaista neophodno za indukciju apoptoze (Ly i sar., 2003), ali jasno je da ima negativan uticaj na homeostazu ćelije. U kontekstu dobijenih rezultata može se zaključiti da promene  $\Delta\Psi_m$  nisu praćene ćelijskom smrću ni u jednoj eksperimentalnoj grupi. Međutim, važno je istaći da se kolaps  $\Delta\Psi_m$  ne događa isključivo tokom narušavanja strukture MM te ne mora biti nužno povezan sa uočenom promenom nivoa Bcl-2. Drugi faktori poput poremećaja unutarćelijske homeostaze  $Ca^{2+}$ , koja je očekivana u hipokampusu obe ishemične grupe obzirom na predočene promene NR2B-

NMDA receptor-posredovane signalizacije, mogu uticati na narušavanje  $\Delta\Psi_m$ . Svakako je moguće da narušena homeostaza tokom I/R biva dodatno kompromitovana delovanjem DHEA 4 sata nakon ishemične povrede. S obzirom na to da DHEA deluje kako direktno, tako i indirektno na brojne receptore u mozgu, potpuno razumevanje događaja u hipokampusu DHEA-tretirane ishemične grupe prevazilazi okvire ove studije.

# ZAKLJUČAK

U skladu sa postavljenim ciljem ove doktorske disertacije i dobijenim rezultatima izvedeni su sledeći zaključci:

1. I/R i/ili DHEA tretman nisu doveli do senzo-motornih deficita i pojave infarktne lezija. Znaci promene strukture tkiva i morfologije neurona udruženi sa neurodegenerativnim promenama u hipokampusu i prečenoj kori nisu uočeni;
2. I/R i/ili akutni DHEA tretman ne ostvaruju efekat na ispitivane parametre oksidativnog stresa. Nivo MDA u homogenatu tkiva hipokampusa i prečene kore, kao i nivo GSH u citosolu obe strukture ostali su nepromenjeni nakon ishemične povrede i DHEA tretmana;
3. I/R dovodi do region-specifičnih promena nivoa proteina vGLUT1 i proteina u sastavu kompleksa NMDA receptora. Zabeležen je porast proteina vGluT1 u sinaptozomima hipokampusa i odsustvo promene u prečenoj kori. Porast nivoa sinaptičkih subjedinica NR1 i NR2B praćen je smanjenjem nivoa PSD-95 u hipokampusu. U prečenoj kori detektovano je smanjenje NR1 subjedinice, dok druge promene nisu uočene. Tretman DHEA ne utiče na nivo vGluT1, kao ni na ekspresiju sinaptičkih subjedinica NMDA receptora u fiziološkim uslovima, dok u ishemičnom stanju ostvaruje diskretne region-specifične efekte vraćajući nivo proteina PSD-95 u hipokampusu i NR1 u prečenoj kori na kontrolnu vrednost;
4. region-specifični efekat I/R i DHEA tretmana pokazan je prilikom analize nivoa nNOS i NO. Detektovan je porast nivoa proteina nNOS i sadržaja NO u citosolnoj frakciji hipokampusa obe ishemične grupe. Nasuprot hipokampusu, u prečenoj kori količina proteina nNOS ostaje nepromenjena, a porast nivoa NO uočen je isključivo nakon I/R dok je tretman DHEA vratio vrednost na kontrolni nivo;

5. shodno promenama uočenim na komponentama ushodne signalizacije u hipokampusu tretiranih ishemičnih životinja pokazano je povećanje pro-apoptoskog odnosa Bax/Bcl-2 i narušavanje  $\Delta\Psi_m$  ukazujući na potencijalno štetan efekat tretmana u ishemičnim uslovima. Delovanje I/R i tretmana DHEA nije dovelo do promena apoptotske signalizacije u prečeonoj kori.

Dobijeni rezultati ukazuju na region-specifične promene signalnog puta NMDA receptor/nNOS/NO 24 sata nakon kratkotrajne ishemije, i pojavu neurotoksičnosti posredovane NMDA receptorom u hipokampusu i odsustvo iste u prečeonoj kori. U ovoj doktorskoj disertaciji je po prvi put pokazan nedostatak efekta akutnog DHEA tretmana na ispitivane parametre u fiziološkim uslovima. Na osnovu dobijenih rezultata treba razmotriti ranije prijavljeni neuroprotektivni efekat DHEA budući da je njegova primena 4 sata nakon kratkotrajne ishemične povrede ukazala na potencijalno pokretanje pro-apoptotskih događaja u hipokampusu.

Dodatno, na osnovu predočenih rezultata može se zaključiti da se 15-minutna obostrana okluzija zajedničkih karotidnih arterija i uspostava krvotoka tokom 24 sata može koristiti kao relevantan model za ispitivanje molekulskih promena koje karakterišu umerena ishemična stanja poput TIA.

# LITERATURA

1. Adams L., Franco M. C., Estevez A. G. (2015) Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Experimental biology and medicine* 240:711-717.
2. Adrain C., Creagh E. M., Martin S. J. (2001) Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *The EMBO journal* 20:6627-6636.
3. Awooda H. A., Lutfi M. F., Sharara G. G., Saeed A. M. (2015) Oxidative/nitrosative stress in rats subjected to focal cerebral ischemia/reperfusion. *International journal of health sciences* 9:17-24.
4. Awooda H. A., Lutfi M. F., Sharara G. M., Saeed A. M. (2013) Role of N-Nitro-L-Arginine-Methylester as anti-oxidant in transient cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Experimental & translational stroke medicine* 5:1.
5. Ayala A., Munoz M. F., Arguelles S. (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014:360438.
6. Bacigaluppi M., Comi G., Hermann D. M. (2010) Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. *The open neurology journal* 4:34-38.
7. Barger S. W., Chavis J. A., Drew P. D. (2000) Dehydroepiandrosterone inhibits microglial nitric oxide production in a stimulus-specific manner. *Journal of neuroscience research* 62:503-509.
8. Barreto G., White R. E., Ouyang Y., Xu L., Giffard R. G. (2011) Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke. *Central nervous system agents in medicinal chemistry* 11:164-173.
9. Bastianetto S., Ramassamy C., Poirier J., Quirion R. (1999) Dehydroepiandrosterone (DHEA) protects hippocampal cells from oxidative stress-induced damage. *Brain research Molecular brain research* 66:35-41.
10. Baulieu E. E. (1998) Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* 23:963-987.
11. Beltran B., Mathur A., Duchon M. R., Erusalimsky J. D., Moncada S. (2000) The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its

role in cell survival or death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:14602-14607.

12. Benarroch E. E. (2010) Glutamate transporters: diversity, function, and involvement in neurologic disease. *Neurology* 74:259-264.

13. Benedek A., Moricz K., Juranyi Z., Gigler G., Levay G., Harsing L. G., Jr., Matyus P., Szenasi G., Albert M. (2006) Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Brain research* 1116:159-165.

14. Bergeron R., de Montigny C., Debonnel G. (1996) Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effects mediated via sigma receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:1193-1202.

15. Bhandari U., Ansari M. N. (2008) Protective effect of aqueous extract of *Embelia ribes* Burm fruits in middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia in rats. *Indian journal of pharmacology* 40:215-220.

16. Broughton B. R., Reutens D. C., Sobey C. G. (2009) Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 40:e331-339.

17. Brown R. C., Cascio C., Papadopoulos V. (2000) Pathways of neurosteroid biosynthesis in cell lines from human brain: regulation of dehydroepiandrosterone formation by oxidative stress and beta-amyloid peptide. *Journal of neurochemistry* 74:847-859.

18. Candelario-Jalil E., Mhadu N. H., Al-Dalain S. M., Martinez G., Leon O. S. (2001) Time course of oxidative damage in different brain regions following transient cerebral ischemia in gerbils. *Neuroscience research* 41:233-241.

19. Cardounel A., Regelson W., Kalimi M. (1999) Dehydroepiandrosterone protects hippocampal neurons against neurotoxin-induced cell death: mechanism of action. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 222:145-149.



20. Cervantes M. I., de Oca Balderas P. M., de Jesus Gutierrez-Banos J., Orozco-Ibarra M., Fernandez-Rojas B., Medina-Campos O. N., Espinoza-Rojo M., Ruiz-Tachiquin M., Ortiz-Plata A., Salazar M. I., Rubio-Osornio M., Castaneda-Saucedo E., Pedraza-Chaverri J., Calzada F., Aguilera P. (2013) Comparison of antioxidant activity of hydroethanolic fresh and aged garlic extracts and their effects on cerebral ischemia. *Food chemistry* 140:343-352.
21. Cervos-Navarro J., Diemer N. H. (1991) Selective vulnerability in brain hypoxia. *Critical reviews in neurobiology* 6:149-182.
22. Chalbot S., Morfin R. (2006) Dehydroepiandrosterone metabolites and their interactions in humans. *Drug metabolism and drug interactions* 22:1-23.
23. Chan P. H. (2004) Mitochondria and neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *Neurochemical research* 29:1943-1949.
24. Chen C. C., Parker C. R., Jr. (2004) Adrenal androgens and the immune system. *Seminars in reproductive medicine* 22:369-377.
25. Chen C. T., Green J. T., Orr S. K., Bazinet R. P. (2008) Regulation of brain polyunsaturated fatty acid uptake and turnover. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 79:85-91.
26. Chen Q., Lesnefsky E. J. (2011) Blockade of electron transport during ischemia preserves bcl-2 and inhibits opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS letters* 585:921-926.
27. Chen Q., Xu H., Xu A., Ross T., Bowler E., Hu Y., Lesnefsky E. J. (2015) Inhibition of Bcl-2 sensitizes mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening in ischemia-damaged mitochondria. *PloS one* 10:e0118834.
28. Chen X., Zhang X., Xue L., Hao C., Liao W., Wan Q. (2017a) Treatment with Enriched Environment Reduces Neuronal Apoptosis in the Periinfarct Cortex after Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 41:1445-1456.
29. Chen Y. F., Wu K. J., Huang W. S., Hsieh Y. W., Wang Y. W., Tsai H. Y., Lee M. M. (2016) Neuroprotection of Gueichih-Fuling-Wan on cerebral

ischemia/ reperfusion injury in streptozotocin-induced hyperglycemic rats via the inhibition of the cellular apoptosis pathway and neuroinflammation. *BioMedicine* 6:21.

30. Chen Y., Khan R. S., Cwanger A., Song Y., Steenstra C., Bang S., Cheah J. H., Dunaief J., Shindler K. S., Snyder S. H., Kim S. F. (2013) *Dexas1*, a small GTPase, is required for glutamate-NMDA neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:3582-3587.

31. Chen Z. Q., Mou R. T., Feng D. X., Wang Z., Chen G. (2017b) The role of nitric oxide in stroke. *Medical gas research* 7:194-203.

32. Choi D. W. (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends in neurosciences* 11:465-469.

33. Clark B. J., Prough R. A., Klinge C. M. (2018) Mechanisms of Action of Dehydroepiandrosterone. *Vitamins and hormones* 108:29-73.

34. Cohen G. M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical journal* 326 ( Pt 1):1-16.

35. Compagnone N. A., Mellon S. H. (2000) Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in neuroendocrinology* 21:1-56.

36. Conrad C. D. (2008) Chronic stress-induced hippocampal vulnerability: the glucocorticoid vulnerability hypothesis. *Reviews in the neurosciences* 19:395-411.

37. Cooper A. J., Kristal B. S. (1997) Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biological chemistry* 378:793-802.

38. Corera A. T., Doucet G., Fon E. A. (2009) Long-term potentiation in isolated dendritic spines. *PloS one* 4:e6021.

39. Corpechot C., Robel P., Axelson M., Sjovall J., Baulieu E. E. (1981) Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78:4704-4707.

40. Corpechot C., Synguelakis M., Talha S., Axelson M., Sjoval J., Vihko R., Baulieu E. E., Robel P. (1983) Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain research* 270:119-125.
41. Cory S., Adams J. M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews Cancer* 2:647-656.
42. Cotman C. W., Matthews D. A. (1971) Synaptic plasma membranes from rat brain synaptosomes: isolation and partial characterization. *Biochimica et biophysica acta* 249:380-394.
43. Coutts S. B. (2017) Diagnosis and Management of Transient Ischemic Attack. *Continuum* 23:82-92.
44. Coyle J. T., Puttfarcken P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689-695.
45. Čovičković-Šternić N., Beslać – Bumbaširević Lj., Kostić V., Radak Đ., Žarkov M., Raičević R., Tončev G., Živković M., Jovanović D., Šantrić Miličević M., Nalić D., Pavlović A.M. (2012) Akutni ishemijski moždani udar, nacionalni vodič. Beograd, Ministarstvo zdravlja Republike Srbije.
46. Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz M. A. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences* 22:391-397.
47. Dlugosz P. J., Billen L. P., Annis M. G., Zhu W., Zhang Z., Lin J., Leber B., Andrews D. W. (2006) Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *The EMBO journal* 25:2287-2296.
48. Dos-Anjos S., Martinez-Villayandre B., Montori S., Regueiro-Purrinos M. M., Gonzalo-Orden J. M., Fernandez-Lopez A. (2009) Transient global ischemia in rat brain promotes different NMDA receptor regulation depending on the brain structure studied. *Neurochemistry international* 54:180-185.
49. Dringen R. (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in neurobiology* 62:649-671.
50. Drose S., Brandt U. (2012) Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Advances in experimental medicine and biology* 748:145-169.

51. Dunkley P. R., Jarvie P. E., Robinson P. J. (2008) A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nature protocols* 3:1718-1728.
52. Durukan Tolvanen, A., Tatlisumak, E., Pedrono, E., Abo-ramadan, U. & Tatlisumak, T. 2017. TIA model is attainable in Wistar rats by intraluminal occlusion of the MCA for 10min or shorter. *Brain Res*, 1663, 166-173.
53. Easton J. D., Saver J. L., Albers G. W., Alberts M. J., Chaturvedi S., Feldmann E., Hatsukami T. S., Higashida R. T., Johnston S. C., Kidwell C. S., Lutsep H. L., Miller E., Sacco R. L., American Heart A., American Stroke Association Stroke C., Council on Cardiovascular S., Anesthesia, Council on Cardiovascular R., Intervention, Council on Cardiovascular N., Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular D. (2009) Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 40:2276-2293.
54. Ehara A., Ueda S. (2009) Application of Fluoro-Jade C in acute and chronic neurodegeneration models: utilities and staining differences. *Acta histochemica et cytochemica* 42:171-179.
55. Eklof B., Siesjo B. K. (1972) The effect of bilateral carotid artery ligation upon acid-base parameters and substrate levels in the rat brain. *Acta physiologica Scandinavica* 86:528-538.
56. Ellman G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics* 82:70-77.
57. Endo H., Kamada H., Nito C., Nishi T., Chan P. H. (2006) Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome c and hippocampal CA1

neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:7974-7983.

58. Epsztein J., Milh M., Bihi R. I., Jorquera I., Ben-Ari Y., Represa A., Crepel V. (2006) Ongoing epileptiform activity in the post-ischemic hippocampus is associated with a permanent shift of the excitatory-inhibitory synaptic balance in CA3 pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:7082-7092.

59. Esterbauer H., Schaur R. J., Zollner H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine* 11:81-128.

60. Esteves, A., Freitas, AC., Rossi-Junior, WC., Fernandes, GJM. (2013) Anatomical arrangement and distribution of the cerebral arterial circle in rats. *J Morphol Sci* 30(2):132-139

61. Evans G. J. (2015) The synaptosome as a model system for studying synaptic physiology. *Cold Spring Harbor protocols* 2015:421-424.

62. Farkas E., Luiten P. G., Bari F. (2007) Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain research reviews* 54:162-180.

63. Fiore C., Inman D. M., Hirose S., Noble L. J., Igarashi T., Compagnone N. A. (2004) Treatment with the neurosteroid dehydroepiandrosterone promotes recovery of motor behavior after moderate contusive spinal cord injury in the mouse. *Journal of neuroscience research* 75:391-400.

64. Fukaya M., Kato A., Lovett C., Tonegawa S., Watanabe M. (2003) Retention of NMDA receptor NR2 subunits in the lumen of endoplasmic reticulum in targeted NR1 knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:4855-4860.

65. Gao Y., Chen T., Lei X., Li Y., Dai X., Cao Y., Ding Q., Lei X., Li T., Lin X. (2016) Neuroprotective effects of polydatin against mitochondrial-dependent apoptosis in the rat cerebral cortex following ischemia/reperfusion injury. *Molecular medicine reports* 14:5481-5488.

66. Gascon S., Deogracias R., Sobrado M., Roda J. M., Renart J., Rodriguez-Pena A., Diaz-Guerra M. (2005) Transcription of the NR1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor is down-regulated by excitotoxic stimulation and cerebral ischemia. *The Journal of biological chemistry* 280:35018-35027.
67. Gascon S., Sobrado M., Roda J. M., Rodriguez-Pena A., Diaz-Guerra M. (2008) Excitotoxicity and focal cerebral ischemia induce truncation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor and cleavage of the scaffolding protein PSD-95. *Molecular psychiatry* 13:99-114.
68. Gauthier L. V., Taub E., Mark V. W., Barghi A., Uswatte G. (2012) Atrophy of spared gray matter tissue predicts poorer motor recovery and rehabilitation response in chronic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 43:453-457.
69. Gil-ad I., Shtauf B., Eshet R., Maayan R., Rehavi M., Weizman A. (2001) Effect of dehydroepiandrosterone and its sulfate metabolite on neuronal cell viability in culture. *The Israel Medical Association journal : IMAJ* 3:639-643.
70. Goldlust E. J., Paczynski R. P., He Y. Y., Hsu C. Y., Goldberg M. P. (1996) Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 27:1657-1662.
71. Goldman-Rakic, P. S. (1996) The prefrontal landscape: implications of functional architecture for understanding human mentation and the central executive. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 351, 1445-53.
72. Gomez-Lazaro M., Galindo M. F., Melero-Fernandez de Mera R. M., Fernandez-Gomez F. J., Concannon C. G., Segura M. F., Comella J. X., Prehn J. H., Jordan J. (2007) Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase activate Bax to induce mitochondrial cytochrome c release and apoptosis in response to malonate. *Molecular pharmacology* 71:736-743.
73. Granzotto A., Sensi S. L. (2015) Intracellular zinc is a critical intermediate in the excitotoxic cascade. *Neurobiology of disease* 81:25-37.

74. Grilo A. L., Mantalaris A. (2019) Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology advances*.
75. Han X. J., Shi Z. S., Xia L. X., Zhu L. H., Zeng L., Nie J. H., Xu Z. C., Ruan Y. W. (2016) Changes in synaptic plasticity and expression of glutamate receptor subunits in the CA1 and CA3 areas of the hippocampus after transient global ischemia. *Neuroscience* 327:64-78.
76. Harukuni I., Bhardwaj A. (2006) Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurologic clinics* 24:1-21.
77. Hathaway W. R., Newton B. W. (2018) *Neuroanatomy, Prefrontal Cortex*. In: StatPearls Treasure Island (FL).
78. Havelock J. C., Auchus R. J., Rainey W. E. (2004) The rise in adrenal androgen biosynthesis: adrenarche. *Seminars in reproductive medicine* 22:337-347.
79. He W., Xu X., Lv Q., Guo L. (2014) Low dose ZD7288 attenuates the ischemia/reperfusion-induced impairment of long-term potentiation induction at hippocampal Schaffer collateral-CA1 synapses. *Cellular and molecular neurobiology* 34:611-617.
80. Heurteaux C., Lauritzen I., Widmann C., Lazdunski M. (1994) Glutamate-induced overexpression of NMDA receptor messenger RNAs and protein triggered by activation of AMPA/kainate receptors in rat hippocampus following forebrain ischemia. *Brain research* 659:67-74.
81. Hisatsune C., Umemori H., Mishina M., Yamamoto T. (1999) Phosphorylation-dependent interaction of the N-methyl-D-aspartate receptor epsilon 2 subunit with phosphatidylinositol 3-kinase. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 4:657-666.
82. Hissin P. J., Hilf R. (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical biochemistry* 74:214-226.
83. Hojo Y., Hattori T. A., Enami T., Furukawa A., Suzuki K., Ishii H. T., Mukai H., Morrison J. H., Janssen W. G., Kominami S., Harada N., Kimoto T.,

- Kawato S. (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:865-870.
84. Horvat A., Nikezic G., Petrovic S., Kanazir D. T. (2001) Binding of estradiol to synaptosomal mitochondria: physiological significance. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 58:636-644.
85. Hsu J. C., Zhang Y., Takagi N., Gurd J. W., Wallace M. C., Zhang L., Eubanks J. H. (1998) Decreased expression and functionality of NMDA receptor complexes persist in the CA1, but not in the dentate gyrus after transient cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 18:768-775.
86. Hu G. Q., Du X., Li Y. J., Gao X. Q., Chen B. Q., Yu L. (2017) Inhibition of cerebral ischemia/reperfusion injury-induced apoptosis: nicotiflorin and JAK2/STAT3 pathway. *Neural regeneration research* 12:96-102.
87. Hu Y., Cardounel A., Gursoy E., Anderson P., Kalimi M. (2000) Anti-stress effects of dehydroepiandrosterone: protection of rats against repeated immobilization stress-induced weight loss, glucocorticoid receptor production, and lipid peroxidation. *Biochemical pharmacology* 59:753-762.
88. Huang J., Philbert M. A. (1996) Cellular responses of cultured cerebellar astrocytes to ethacrynic acid-induced perturbation of subcellular glutathione homeostasis. *Brain research* 711:184-192.
89. Iadecola, C. i Anrather, J. 2011. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*, 17, 796-808.
90. Imamura M., Prasad C. (1998) Modulation of GABA-gated chloride ion influx in the brain by dehydroepiandrosterone and its metabolites. *Biochemical and biophysical research communications* 243:771-775.



91. Johansson S., Povlsen G. K., Edvinsson L. (2012) Expressional changes in cerebrovascular receptors after experimental transient forebrain ischemia. *PloS one* 7:e41852.
92. Joseph, L., Nambi,V., Kim, E.S.H., (2018) *Cardiology Secrets*, fifth ed., in: Joseph, L., *Carotid Artery Disease*. Elsevier, Philadelphia, pp. 485-492.
93. Kaasik A., Kalda A., Jaako K., Zharkovsky A. (2001) Dehydroepiandrosterone sulphate prevents oxygen-glucose deprivation-induced injury in cerebellar granule cell culture. *Neuroscience* 102:427-432.
94. Kalimi M., Shafagoj Y., Loria R., Padgett D., Regelson W. (1994) Anti-glucocorticoid effects of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Molecular and cellular biochemistry* 131:99-104.
95. Kalogeris T., Baines C. P., Krenz M., Korthuis R. J. (2012) Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International review of cell and molecular biology* 298:229-317.
96. Kalogeris T., Bao Y., Korthuis R. J. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox biology* 2:702-714.
97. Karishma K. K., Herbert J. (2002) Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. *The European journal of neuroscience* 16:445-453.
98. Kavakli A. S., Ayoglu R. U., Ozturk N. K., Sagdic K., Yilmaz M., Inanoglu K., Emmiler M. (2015) Simultaneous Bilateral Carotid Endarterectomy under Cervical Plexus Blockade. *Turkish journal of anaesthesiology and reanimation* 43:367-370.
99. Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26:239-257.

100. Kesner R. P., Churchwell J. C. (2011) An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiology of learning and memory* 96:417-431.
101. Kim J. S. (2014) Symptoms of transient ischemic attack. *Frontiers of neurology and neuroscience* 33:82-102.
102. Kimonides V. G., Khatibi N. H., Svendsen C. N., Sofroniew M. V., Herbert J. (1998) Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:1852-1857.
103. Kimonides V. G., Spillantini M. G., Sofroniew M. V., Fawcett J. W., Herbert J. (1999) Dehydroepiandrosterone antagonizes the neurotoxic effects of corticosterone and translocation of stress-activated protein kinase 3 in hippocampal primary cultures. *Neuroscience* 89:429-436.
104. Kurata K., Takebayashi M., Morinobu S., Yamawaki S. (2004) beta-estradiol, dehydroepiandrosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate protect against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by different mechanisms. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 311:237-245.
105. L L., X W., Z Y. (2016) Ischemia-reperfusion Injury in the Brain: Mechanisms and Potential Therapeutic Strategies. *Biochemistry & pharmacology* : open access 5.
106. Labrie F. (2004) Adrenal androgens and intracrinology. *Seminars in reproductive medicine* 22:299-309.
107. Lai S. L., Chen Y. C., Weng H. H., Chen S. T., Hsu S. P., Lee T. H. (2005) Bilateral common carotid artery occlusion--a case report and literature review. *Journal of the neurological sciences* 238:101-104.
108. Lai T. W., Shyu W. C., Wang Y. T. (2011) Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond. *Trends in molecular medicine* 17:266-275.

109. Lapchak P. A., Chapman D. F., Nunez S. Y., Zivin J. A. (2000) Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective in a reversible spinal cord ischemia model: possible involvement of GABA(A) receptors. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 31:1953-1956; discussion 1957.
110. Laurine E., Lafitte D., Gregoire C., Seree E., Loret E., Douillard S., Michel B., Briand C., Verdier J. M. (2003) Specific binding of dehydroepiandrosterone to the N terminus of the microtubule-associated protein MAP2. *The Journal of biological chemistry* 278:29979-29986.
111. Lee R. M. (1995) Morphology of cerebral arteries. *Pharmacology & therapeutics* 66:149-173.
112. Lee S. J., Cho K. S., Koh J. Y. (2009) Oxidative injury triggers autophagy in astrocytes: the role of endogenous zinc. *Glia* 57:1351-1361.
113. Lee S. J., Koh J. Y. (2010) Roles of zinc and metallothionein-3 in oxidative stress-induced lysosomal dysfunction, cell death, and autophagy in neurons and astrocytes. *Molecular brain* 3:30.
114. Li H., Klein G., Sun P., Buchan A. M. (2001) Dehydroepiandrosterone (DHEA) reduces neuronal injury in a rat model of global cerebral ischemia. *Brain research* 888:263-266.
115. Li P., Hu X., Gan Y., Gao Y., Liang W., Chen J. (2011) Mechanistic insight into DNA damage and repair in ischemic stroke: exploiting the base excision repair pathway as a model of neuroprotection. *Antioxidants & redox signaling* 14:1905-1918.
116. Li R., Wang S., Zhu L., Guo J., Zeng L., Gong Q., He L., Chen H. (2013) Aberrant functional connectivity of resting state networks in transient ischemic attack. *PloS one* 8:e71009.
117. Li X. J., Liang L., Shi H. X., Sun X. P., Wang J., Zhang L. S. (2017) Neuroprotective effects of curdione against focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats. *Neuropsychiatric disease and treatment* 13:1733-1740.
118. Li Z., Cui S., Zhang Z., Zhou R., Ge Y., Sokabe M., Chen L. (2009) DHEA-neuroprotection and -neurotoxicity after transient cerebral ischemia in rats.

Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 29:287-296.

119. Liu D., Dillon J. S. (2002) Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3). The Journal of biological chemistry 277:21379-21388.

120. Liu D., Dillon J. S. (2004) Dehydroepiandrosterone stimulates nitric oxide release in vascular endothelial cells: evidence for a cell surface receptor. Steroids 69:279-289.

121. Liu Z., Zhao W., Xu T., Pei D., Peng Y. (2010) Alterations of NMDA receptor subunits NR1, NR2A and NR2B mRNA expression and their relationship to apoptosis following transient forebrain ischemia. Brain research 1361:133-139.

122. Llorente I. L., Perez-Rodriguez D., Burgin T. C., Gonzalo-Orden J. M., Martinez-Villayandre B., Fernandez-Lopez A. (2013) Age and meloxicam modify the response of the glutamate vesicular transporters (VGLUTs) after transient global cerebral ischemia in the rat brain. Brain research bulletin 94:90-97.

123. Lowry O. H., Passonneau J. V., Hasselberger F. X., Schulz D. W. (1964) Effect of Ischemia on Known Substrates and Cofactors of the Glycolytic Pathway in Brain. The Journal of biological chemistry 239:18-30.

124. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of biological chemistry 193:265-275.

125. Lu X. C., Williams A. J., Yao C., Berti R., Hartings J. A., Whipple R., Vahey M. T., Polavarapu R. G., Woller K. L., Tortella F. C., Dave J. R. (2004) Microarray analysis of acute and delayed gene expression profile in rats after focal ischemic brain injury and reperfusion. Journal of neuroscience research 77:843-857.

126. Luczak E. D., Anderson M. E. (2014) CaMKII oxidative activation and the pathogenesis of cardiac disease. *Journal of molecular and cellular cardiology* 73:112-116.
127. Ly J. D., Grubb D. R., Lawen A. (2003) The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi(m)$ ) in apoptosis; an update. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 8:115-128.
128. Majewska M. D. (1992) Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Progress in neurobiology* 38:379-395.
129. Mamo Y.A. (2015). Cerebrovascular effects of vasoactive drugs: in vitro, in vivo and clinical investigations.
130. Maninger N., Wolkowitz O. M., Reus V. I., Epel E. S., Mellon S. H. (2009) Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Frontiers in neuroendocrinology* 30:65-91.
131. Markwell M. A., Haas S. M., Bieber L. L., Tolbert N. E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical biochemistry* 87:206-210.
132. Marsden V. S., Ekert P. G., Van Delft M., Vaux D. L., Adams J. M., Strasser A. (2004) Bcl-2-regulated apoptosis and cytochrome c release can occur independently of both caspase-2 and caspase-9. *The Journal of cell biology* 165:775-780.
133. Marsden V. S., Strasser A. (2003) Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annual review of immunology* 21:71-105.
134. Marx C. E., Jarskog L. F., Lauder J. M., Gilmore J. H., Lieberman J. A., Morrow A. L. (2000) Neurosteroid modulation of embryonic neuronal survival in vitro following anoxia. *Brain research* 871:104-112.
135. Maurice T., Gregoire C., Espallergues J. (2006) Neuro(active)steroids actions at the neuromodulatory sigma1 (sigma1) receptor: biochemical and

- physiological evidences, consequences in neuroprotection. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 84:581-597.
136. Melchior C. L., Ritzmann R. F. (1994) Dehydroepiandrosterone is an anxiolytic in mice on the plus maze. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 47:437-441.
137. Mollace V., Muscoli C., Masini E., Cuzzocrea S., Salvemini D. (2005) Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacological reviews* 57:217-252.
138. Morgan B. (2014) Reassessing cellular glutathione homeostasis: novel insights revealed by genetically encoded redox probes. *Biochemical Society transactions* 42:979-984.
139. Moro M. A., Almeida A., Bolanos J. P., Lizasoain I. (2005) Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free radical biology & medicine* 39:1291-1304.
140. Naert G., Maurice T., Tapia-Arancibia L., Givalois L. (2007) Neuroactive steroids modulate HPA axis activity and cerebral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in adult male rats. *Psychoneuroendocrinology* 32:1062-1078.
141. Narne P., Pandey V., Phanithi P. B. (2018) Role of Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide in Ischemic Stroke and the Emergent Epigenetic Underpinnings. *Molecular neurobiology*.
142. Navarro-Gonzalvez J. A., Garcia-Benayas C., Arenas J. (1998) Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clinical chemistry* 44:679-681.
143. Nelson C. W., Wei E. P., Povlishock J. T., Kontos H. A., Moskowitz M. A. (1992) Oxygen radicals in cerebral ischemia. *The American journal of physiology* 263:H1356-1362.
144. Nigam S., Schewe T. (2000) Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation. *Biochimica et biophysica acta* 1488:167-181.

145. Nita D. A., Nita V., Spulber S., Moldovan M., Popa D. P., Zagrean A. M., Zagrean L. (2001) Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion - a biochemical study in rat. *Journal of cellular and molecular medicine* 5:163-170.
146. Pachernegg S., Strutz-Seebohm N., Hollmann M. (2012) GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. *Trends in neurosciences* 35:240-249.
147. Panuganti K. K., Dulebohn S. C. (2018) Transient Ischemic Attack. In: *StatPearls Treasure Island (FL)*.
148. Parker L. N., Odell W. D. (1980) Control of adrenal androgen secretion. *Endocrine reviews* 1:392-410.
149. Parola M., Bellomo G., Robino G., Barrera G., Dianzani M. U. (1999) 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxidants & redox signaling* 1:255-284.
150. Pedrono E., Durukan A., Strbian D., Marinkovic I., Shekhar S., Pitkonen M., Abo-ramadan U. & Tatlisumak T. (2010) An optimized mouse model for transient ischemic attack. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69, 188-95.
151. Perez-Neri I., Montes S., Ojeda-Lopez C., Ramirez-Bermudez J., Rios C. (2008) Modulation of neurotransmitter systems by dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate: mechanism of action and relevance to psychiatric disorders. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 32:1118-1130.
152. Petrovic S., Velickovic N., Stanojevic I., Milosevic M., Drakulic D., Stanojlovic M., Horvat A. (2011) Inhibition of mitochondrial Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> efflux by 17beta-estradiol in the rat hippocampus. *Neuroscience* 192:195-204.
153. Pigeolet E., Remacle J. (1991) Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals. *Free radical biology & medicine* 11:191-195.

154. Placzek W. J., Wei J., Kitada S., Zhai D., Reed J. C., Pellecchia M. (2010) A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. *Cell death & disease* 1:e40.
155. Popov A., Mirkov I., Zolotarevski L., Jovic M., Belij S., Kataranovski D., Kataranovski M. (2011) Local proinflammatory effects of repeated skin exposure to warfarin, an anticoagulant rodenticide in rats. *Biomedical and environmental sciences : BES* 24:180-189.
156. Puig B., Brenna S., Magnus T. (2018) Molecular Communication of a Dying Neuron in Stroke. *International journal of molecular sciences* 19.
157. Pulsinelli W. A., Buchan A. M. (1988) The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke* 19, 913-914.
158. Quinn, T. Alexander i sar. (2018) "Chapter 3 Dehydroepiandrosterone ( DHEA ) and DHEA Sulfate : Roles in Brain Function and Disease."
159. Raisova M., Hossini A. M., Eberle J., Riebeling C., Wieder T., Sturm I., Daniel P. T., Orfanos C. E., Geilen C. C. (2001) The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *The Journal of investigative dermatology* 117:333-340.
160. Rameau G. A., Chiu L. Y., Ziff E. B. (2004) Bidirectional regulation of neuronal nitric-oxide synthase phosphorylation at serine 847 by the N-methyl-D-aspartate receptor. *The Journal of biological chemistry* 279:14307-14314.
161. Ren Z., Zhang R., Li Y., Li Y., Yang Z., Yang H. (2017) Ferulic acid exerts neuroprotective effects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury via antioxidant and anti-apoptotic mechanisms in vitro and in vivo. *International journal of molecular medicine* 40:1444-1456.
162. Reznikov K.Y. (1991) Hippocampal Formation in the Mouse and Rat – Structural Organization and Development: A Review. In: *Cell Proliferation and Cytogenesis in the Mouse Hippocampus. Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology*, vol 122. Springer, Berlin, Heidelberg



163. Robinson N. J., Winge D. R. (2010) Copper metallochaperones. Annual review of biochemistry 79:537-562.
164. Robison A. J., Bartlett R. K., Bass M. A., Colbran R. J. (2005) Differential modulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II activity by regulated interactions with N-methyl-D-aspartate receptor NR2B subunits and alpha-actinin. The Journal of biological chemistry 280:39316-39323.
165. Russo E., Nguyen H., Lippert T., Tuazon J., Borlongan C. V., Napoli E. (2018) Mitochondrial targeting as a novel therapy for stroke. Brain circulation 4:84-94.
166. Safiulina D., Peet N., Seppet E., Zharkovsky A., Kaasik A. (2006) Dehydroepiandrosterone inhibits complex I of the mitochondrial respiratory chain and is neurotoxic in vitro and in vivo at high concentrations. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 93:348-356.
167. Sakr H. F., Khalil K. I., Hussein A. M., Zaki M. S., Eid R. A., Alkhateeb M. (2014) Effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on memory and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in a rat model of vascular dementia. Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society 65:41-53.
168. Salbitani, G., Bottone, C. and Carfagna, S. (2017). Determination of Reduced and Total Glutathione Content in Extremophilic Microalga *Galdieria phlegrea*. Bio-protocol 7(13): e2372. DOI: 10.21769/BioProtoc.2372.
169. Salerno J. C., Ray K., Poulos T., Li H., Ghosh D. K. (2013) Calmodulin activates neuronal nitric oxide synthase by enabling transitions between conformational states. FEBS letters 587:44-47.
170. Salter M. W., Kalia L. V. (2004) Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. Nature reviews Neuroscience 5:317-328.
171. Salvador-Gallego R., Mund M., Cosentino K., Schneider J., Unsay J., Schraermeyer U., Engelhardt J., Ries J., Garcia-Saez A. J. (2016) Bax assembly

into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores. The EMBO journal 35:389-401.

172. Sanderson T. H., Reynolds C. A., Kumar R., Przyklenk K., Huttemann M. (2013) Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Molecular neurobiology* 47:9-23.

173. Schimidt H. L., Vieira A., Altermann C., Martins A., Sosa P., Santos F. W., Mello-Carpes P. B., Izquierdo I., Carpes F. P. (2014) Memory deficits and oxidative stress in cerebral ischemia-reperfusion: neuroprotective role of physical exercise and green tea supplementation. *Neurobiology of learning and memory* 114:242-250.

174. Schroeder T., Sillesen H., Engell H. C. (1986) Staged bilateral carotid endarterectomy. *Journal of vascular surgery* 3:355-359.

175. Seamans J. K., Lapish C. C., Durstewitz D. (2008) Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: insights from electrophysiology. *Neurotoxicity research* 14:249-262.

176. Shahani N., Sawa A. (2012) Protein S-nitrosylation: role for nitric oxide signaling in neuronal death. *Biochimica et biophysica acta* 1820:736-742.

177. Shaw, C. (Ed.). (1998). *Glutathione In The Nervous System*. New York: Routledge, <https://doi.org/10.1201/9780203753088>

178. Sheng M., Kim E. (2011) The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3.

179. Shenoda B. (2015) The role of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger subtypes in neuronal ischemic injury. *Translational stroke research* 6:181-190.

180. Shichiri M. (2014) The role of lipid peroxidation in neurological disorders. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 54:151-160.

181. Sicard F., Ehrhart-Bornstein M., Corbeil D., Sperber S., Krug A. W., Ziegler C. G., Rettori V., McCann S. M., Bornstein S. R. (2007) Age-dependent regulation of chromaffin cell proliferation by growth factors,

- dehydroepiandrosterone (DHEA), and DHEA sulfate. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104:2007-2012.
182. Sicard K. M., Fisher M. (2009) Animal models of focal brain ischemia. *Experimental & translational stroke medicine* 1:7.
183. Siemkowicz E., Gjedde A. (1980) Post-ischemic coma in rat: effect of different pre-ischemic blood glucose levels on cerebral metabolic recovery after ischemia. *Acta physiologica Scandinavica* 110:225-232.
184. Simoncini T., Mannella P., Fornari L., Varone G., Caruso A., Genazzani A. R. (2003) Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms. *Endocrinology* 144:3449-3455.
185. Smith M. L., Auer R. N., Seisjo B. K. (1984) The density and distribution of ischaemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischaemia. *Acta Neuropathol (Berl)* 64, 319-32.
186. Sommer C. J. (2017) Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta neuropathologica* 133:245-261.
187. Sousa A., Ticku M. K. (1997) Interactions of the neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate with the GABA(A) receptor complex reveals that it may act via the picrotoxin site. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 282:827-833.
188. Sturgill J. F., Steiner P., Czervionke B. L., Sabatini B. L. (2009) Distinct domains within PSD-95 mediate synaptic incorporation, stabilization, and activity-dependent trafficking. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:12845-12854.
189. Subburaj Y., Cosentino K., Axmann M., Pedrueza-Villalmanzo E., Hermann E., Bleicken S., Spatz J., Garcia-Saez A. J. (2015) Bax monomers form dimer units in the membrane that further self-assemble into multiple oligomeric species. *Nature communications* 6:8042.
190. Sun M. S., Jin H., Sun X., Huang S., Zhang F. L., Guo Z. N., Yang Y. (2018) Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in

Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2018:3804979.

191. Svec F., Porter J. (1997) The effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on Zucker rat food selection and hypothalamic neurotransmitters. *Psychoneuroendocrinology* 22 Suppl 1:S57-62.

192. Takahashi N., Kozai D., Kobayashi R., Ebert M., Mori Y. (2011) Roles of TRPM2 in oxidative stress. *Cell calcium* 50:279-287.

193. Tamagno E., Guglielmotto M., Bardini P., Santoro G., Davit A., Di Simone D., Danni O., Tabaton M. (2003) Dehydroepiandrosterone reduces expression and activity of BACE in NT2 neurons exposed to oxidative stress. *Neurobiology of disease* 14:291-301.

194. Traynelis S. F., Wollmuth L. P., McBain C. J., Menniti F. S., Vance K. M., Ogden K. K., Hansen K. B., Yuan H., Myers S. J., Dingledine R. (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews* 62:405-496.

195. Traystman R. J. (2003) Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 44:85-95.

196. Trimmer B. A., Aprille J. R., Dudzinski D. M., Lagace C. J., Lewis S. M., Michel T., Qazi S., Zayas R. M. (2001) Nitric oxide and the control of firefly flashing. *Science* 292:2486-2488.

197. Uchida K. (1999) Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. *Trends in cardiovascular medicine* 9:109-113.

198. Ulbrich M. H., Isacoff E. Y. (2008) Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:14163-14168.

199. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M., Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39:44-84.

200. Vaseva A. V., Marchenko N. D., Ji K., Tsirka S. E., Holzmann S., Moll U. M. (2012) p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell* 149:1536-1548.
201. Veit F., Pak O., Brandes R. P., Weissmann N. (2015) Hypoxia-dependent reactive oxygen species signaling in the pulmonary circulation: focus on ion channels. *Antioxidants & redox signaling* 22:537-552.
202. Vigneault E., Poirel O., Riad M., Prud'homme J., Dumas S., Turecki G., Fasano C., Mechawar N., El Mestikawy S. (2015) Distribution of vesicular glutamate transporters in the human brain. *Frontiers in neuroanatomy* 9:23.
203. Vinade L., Petersen J. D., Do K., Dosemeci A., Reese T. S. (2001) Activation of calpain may alter the postsynaptic density structure and modulate anchoring of NMDA receptors. *Synapse* 40:302-309.
204. Vyklicky V., Korinek M., Smejkalova T., Balik A., Krausova B., Kaniakova M., Lichnerova K., Cerny J., Krusek J., Dittert I., Horak M., Vyklicky L. (2014) Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological research* 63 Suppl 1:S191-203.
205. Walder C. E., Green S. P., Darbonne W. C., Mathias J., Rae J., Dinauer M. C., Curnutte J. T., Thomas G. R. (1997) Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 28:2252-2258.
206. Walters R. J., Fox N. C., Schott J. M., Crum W. R., Stevens J. M., Rossor M. N., Thomas D. J. (2003) Transient ischaemic attacks are associated with increased rates of global cerebral atrophy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 74:213-216.
207. Wang M. J., Huang H. M., Chen H. L., Kuo J. S., Jeng K. C. (2001) Dehydroepiandrosterone inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV-2 microglia. *Journal of neurochemistry* 77:830-838.
208. Warner D. S., Sheng H., Batinic-Haberle I. (2004) Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *The Journal of experimental biology* 207:3221-3231.

209. Waxman E. A., Lynch D. R. (2005) N-methyl-D-aspartate receptor subtype mediated bidirectional control of p38 mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 280:29322-29333.
210. Wayman C., Duricki D. A., Roy L. A., Haenzi B., Tsai S. Y., Kartje G., Beech J. S., Cash D., Moon L. (2016) Performing Permanent Distal Middle Cerebral with Common Carotid Artery Occlusion in Aged Rats to Study Cortical Ischemia with Sustained Disability. *Journal of visualized experiments : JoVE* 53106.
211. Webb S. J., Geoghegan T. E., Prough R. A., Michael Miller K. K. (2006) The biological actions of dehydroepiandrosterone involves multiple receptors. *Drug metabolism reviews* 38:89-116.
212. White B. C., Sullivan J. M., DeGracia D. J., O'Neil B. J., Neumar R. W., Grossman L. I., Rafols J. A., Krause G. S. (2000) Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the neurological sciences* 179:1-33.
213. Wicha P., Tocharus J., Janyou A., Jittiwat J., Changtam C., Suksamrarn A., Tocharus C. (2017) Hexahydrocurcumin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury, attenuates inflammation, and improves antioxidant defenses in a rat stroke model. *PloS one* 12:e0189211.
214. Widstrom R. L., Dillon J. S. (2004) Is there a receptor for dehydroepiandrosterone or dehydroepiandrosterone sulfate? *Seminars in reproductive medicine* 22:289-298.
215. Wu Q. J., Tymianski M. (2018) Targeting NMDA receptors in stroke: new hope in neuroprotection. *Molecular brain* 11:15.
216. Yaidikar L., Byna B., Thakur S. R. (2014) Neuroprotective effect of punicalagin against cerebral ischemia reperfusion-induced oxidative brain injury in rats. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association* 23:2869-2878.
217. Yoshioka M., Tanaka K., Miyazaki I., Fujita N., Higashi Y., Asanuma M., Ogawa N. (2002) The dopamine agonist cabergoline provides neuroprotection

- by activation of the glutathione system and scavenging free radicals. *Neuroscience research* 43:259-267.
218. Zamzami N., Marchetti P., Castedo M., Zanin C., Vayssiere J. L., Petit P. X., Kroemer G. (1995) Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *The Journal of experimental medicine* 181:1661-1672.
219. Zeng G., Ding W., Li Y., Sun M., Deng L. (2018) Morroniside protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting neuron apoptosis and MMP2/9 expression. *Experimental and therapeutic medicine* 16:2229-2234.
220. Zhang L., Hsu J. C., Takagi N., Gurd J. W., Wallace M. C., Eubanks J. H. (1997) Transient global ischemia alters NMDA receptor expression in rat hippocampus: correlation with decreased immunoreactive protein levels of the NR2A/2B subunits, and an altered NMDA receptor functionality. *Journal of neurochemistry* 69:1983-1994.
221. Zhou L., Zhu D. Y. (2009) Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric oxide : biology and chemistry* 20:223-230.
222. Zhou Q., Sheng M. (2013) NMDA receptors in nervous system diseases. *Neuropharmacology* 74:69-75.
223. Zille M., Farr T. D., Przesdzin I., Muller J., Sommer C., Dirnagl U., Wunder A. (2012) Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems, and perspectives. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32:213-231.
224. Zorova L. D., Popkov V. A., Plotnikov E. Y., Silachev D. N., Pevzner I. B., Jankauskas S. S., Babenko V. A., Zorov S. D., Balakireva A. V., Juhaszova M., Sollott S. J., Zorov D. B. (2018) Mitochondrial membrane potential. *Analytical biochemistry* 552:50-59.

# **PRILOZI**



## Biografija autora

Marina M. Zarić rođena je 27.04.1990. godine u Beogradu. Četvrtu Gimnaziju u Beogradu završila je 2009. i iste godine upisala Biološki fakultet, Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija. 2013. godine završila je osnovne akademske studije i upisala master akademske studije, smer Eksperimentalna biomedicina. Master rad pod nazivom „Efekat izlaganja pacova visokoj i niskoj ambijentalnoj temperaturi na nivo dopamin  $\beta$ -hidroksilaze u hipotalamusu“ odbranila je 2014. godine sa završnom ocenom 10 na Katerdi za fiziologiju i ekofiziologiju pod rukovodstvom prof. dr Nebojše Jasnića. Iste godine upisala je doktorske studije, modul Eksperimentalna neurobiologija, na Katedri za opštu fiziologiju i biofiziku, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Trenutno je zaposlena kao istraživač-saradnik u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke VINČA. Njeno istraživanje fokusirano je na molekulske mehanizme koji karakterišu moždanu ishemiju, kao i efekte tretmana dehidroepiandrosteronom. Naučno-istraživački rad Marine M. Zarić realizovan je kroz projekat: „Molekularni mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama CNS-a i perifernog tkiva kod sisara“ (OI 173044, 2015-) koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Upravo u okviru tekućeg projekta ostvaren je i istraživački zadatak koji se odnosi na izradu njene doktorske disertacije pod mentorstvom dr Jelene Martinović i prof. dr Nadežde Nedeljković. Pored pomenutog nacionalnog projekta bila je angažovana i na međunarodnom projektu „Risk reduction-inhibition by phytochemical products of oral lesions induced by smokeless tobacco (Swedish snus)“ (2016-2017).

Autor je 2 i koautor 7 radova u vodećim međunarodnim časopisima, kao i brojnih međunarodnih i domaćih kongresnih saopštenja štampanih u celini i izvodu.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а: Марина М. Зарић

број индекса: Б3020/2014

### Изјављујем

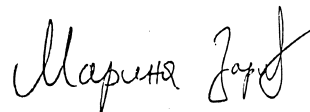
да је докторска дисертација под насловом

**„Ефекат краткотрајне мождане исхемије/реперфузије и третмана дехидроепиандростероном на компоненте сигналног пута NMDA рецептора у хипокампусу и пречеоној кори 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.

У Београду, \_\_\_\_\_

Потпис докторанда



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Марина М. Зарић

Број индекса: Б3020/2014

Студијски програм: Експериментална неуробиологија

Наслов рада: „Ефекат краткотрајне моздане исхемије/реперфузије и третмана дехидроепиандростероном на компоненте сигналног пута NMDA рецептора у хипокампусу и пречеоној кори пацова“

Ментори: др Јелена Мартиновић и проф. др Надежда Недељковић

Потписани/а: Марина М. Зарић

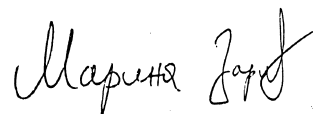
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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.

У Београду, \_\_\_\_\_

**Потпис докторанда**



### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

„Ефекат краткотрајне мождане исхемије/реперфузије и третмана дехидроепиандростероном на компоненте сигналног пута NMDA рецептора у хипокампусу и пречеоној кори пацова“

која је моје ауторско дело.

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

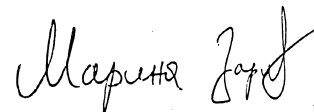
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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).

У Београду, \_\_\_\_\_

**Потпис докторанда**



1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.