



УНИВЕРЗИТЕТ ОДБРАНЕ У БЕОГРАДУ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
ВОЈНОМЕДИЦИНСКЕ АКАДЕМИЈЕ

Јелена Станојевић

**МОДУЛАЦИЈСКИ ЕФЕКАТ ИНТЕРМИТЕНТОГ ОБЛИКА  
СТИМУЛАЦИЈЕ ТЕТА ПРАСКОВИМА НА ОКСИДАТИВНО  
СТАЊЕ И АКТИВАЦИЈУ ГЛИЈЕ У СЕЛЕКТИВНО  
ОСЕТЉИВИМ МОЖДАНИМ СТРУКТУРАМА НА МОДЕЛУ  
СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ ИЗАЗВАНЕ АЛЦХАЈМЕРОВЕ  
ДЕМЕНЦИЈЕ**

докторска дисертација

Београд, 2024. година



UNIVERSITY OF DEFENCE IN BELGRADE  
MEDICAL FACULTY OF  
MILITARY MEDICAL ACADEMY

Jelena Stanojevic

**MODULATION EFFECT OF INTERMITTENT THETA BURST  
STIMULATION ON THE OXIDATIVE STATE AND GLIA  
ACTIVATION IN SELECTIVELY VULNERABLE BRAIN  
STRUCTURES IN THE MODEL OF STREPTOZOTOCIN-  
INDUCED ALZHEIMER'S DEMENTIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

Име и презиме: Јелена Станојевић

Наслов: Модулацијски ефекат интермитентног облика стимулације тета прасковима на оксидативно стање и активацију глије у селективно осетљивим можданим структурама на моделу стрептозотоцином изазване Алцхајмерове деменције

Установа где је рад израђен: Институт за медицинска истраживања Војномедицинске академије у Београду.

Ментор, доц. др Ивана Стевановић, научни саветник, Медицински факултет Војномедицинске академије, Универзитет одбране, Београд, неуробиологија

Комисија за оцену теме и тезе:

1. проф. др Милица Нинковић, редовни професор, Медицински факултет Војномедицинске академије, Универзитет одбране, Београд, физиологија, председник
2. проф. др Ивана Стојановић, редовни професор, Медицински факултет, Универзитет у Нишу, биохемија, члан
3. др Милорад Драгић, научни сарадник, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, неуробиологија, члан

Комисија за оцену готове докторске дисертације:

1. проф. др Милица Нинковић, редовни професор, Медицински факултет Војномедицинске академије, Универзитет одбране, Београд, физиологија, председник
2. проф. др Ивана Стојановић, редовни професор, Медицински факултет, Универзитет у Нишу, биохемија, члан
3. науч. сар. др Милорад Драгић, научни сарадник, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, неуробиологија, члан

## АПСТРАКТ

Интрацеребровентрикуларна (ицв) примена стрептозотоцина (СТЗ) је модел спорадичне Алцхајмерове болести (АБ) на коме је терапијски примењен интермитентни облик стимулације тета прасковима (*iTBS*) који представља неинвазивну технику за стимулацију неуронске и глијске активности са способношћу индуковања дуготрајне пластичности. Циљ студије био је истражити ефекат десетодневне примене *iTBS* протокола на моделу патологије сличне АБ у контексту антиоксидативних, антиинфламаторних и антиамилоидогених ефеката у кортексу, стријатуму, хипокампусу и малом мозгу заједно са бихејвиоралним променама.

Мужјаци *Wistar* пацова су подељени у пет експерименталних група: контролна (ицв апликован физиолошки раствор), СТЗ (билатерална ицв апликација СТЗ; 3 mg/kg), СТЗ+*iTBS* (СТЗ пацови подвргнути *iTBS* протоколу), контрола+*iTBS* (контролна група подвргнута *iTBS* протоколу) и СТЗ+плацебо (СТЗ пацови изложени звуку апарата).

Резултати теста ротационог цилиндра су показали да СТЗ нема утицај на моторичке функције, док су резултати тестова у зракастом лавиринту показали да *iTBS* ублажава оштећење учења и памћења изазвано применом СТЗ. Стимулација смањује СТЗ-ом индуковану повећану имунореактивност *Iba+* и *GFAP+ / VIM+* ћелија која одражава реактивну глиозу у хипокампусу и перивентрикуларним регионима. Биохемијским анализама је утврђено да СТЗ изазива оксидативни и нитрозативни стрес и оксидативно оштећење биолошких молекула ( $O_2^{\bullet}$ ,  $NO_2 + NO_3$ , *MDA*, *8-OHdG*), смањује антиоксидативни капацитет (*SOD*, *CAT*, *GSH*, *SH*, *NRF2*), индукује амилоидогенезу (*EGFR1*, *APP*,  $A\beta_{1-42}$ ) и смањује експресију *BDNF*, док *iTBS* ублажава ове промене и враћа их на контролни ниво.

Добијени резултати пружају експерименталне доказе о корисним ефектима примењеног *iTBS* протокола у смањењу неуротоксичности изазване СТЗ-ом и указују на потенцијал овог типа стимулације у терапијском приступу неуроинфламаторним болестима које резултују оштећеним учењем и памћењем, као што је АБ. Свеукупно, резултати указују на могућност примене *iTBS* као додатне терапије за АБ, јер испољава антиоксидативна, антиамилоидогена и антиинфламаторна својства у животињском моделу СТЗ-индуковане сАБ.

**Кључне речи:** Алцхајмерова болест, стрептозотоцин, *iTBS*, глија, оксидативни стрес, бихејвиор.

## ABSTRACT

Intracerebroventricularly (icv) injected streptozotocin (STZ) is the model of sporadic Alzheimer's disease (AD). The iTBS is a non-invasive approach for stimulating neuronal and glial activity with the ability to induce long-term potentiation-like plasticity. The aim was to investigate the effect of a ten-day application of the iTBS protocol on a model of AD-like pathology in the context of antioxidant, anti-inflammatory, and anti-amyloidogenic effects in the cortex, striatum, hippocampus, and cerebellum along with behavioral changes.

Male Wistar rats were assigned to five groups: 1. Control (icv saline solution), 2. STZ (bilaterally icv-STZ; 3mg/kg), 3. STZ+iTBS (STZ subjected to iTBS therapy), 4. STZ+ placebo (STZ subjected to noise artifact) and 5. Control+iTBS (controls subjected to iTBS).

The RotaRod test result showed that STZ did not alter motor function in rats. The eight-arm radial maze test results showed that iTBS significantly improved learning and memory impairment induced by STZ intoxication. Reactive gliosis in the hippocampus and periventricular area manifested through elevated levels of Iba1<sup>+</sup> and GFAP<sup>+</sup>/VIM<sup>+</sup> immunoreactivity following icv-STZ, was ameliorated after iTBS treatment. Biochemical analyses revealed that STZ causes oxidative/ nitrosative stress and oxidative damage of biological molecules (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, NO<sub>2</sub> + NO<sub>3</sub>, MDA, 8-OHdG), attenuates the antioxidant capacity (SOD, CAT, GSH, SH, NRF2), induces amyloidogenesis (EGR1, APP, Aβ1-42) and reduces BDNF expression, while iTBS restores these changes.

The obtained results represent experimental evidence on the beneficial effects of the iTBS protocol and identify it as an effective therapeutic candidate against STZ-induced neurotoxicity and AD-like changes. This indicates the potential of the iTBS in treating neuroinflammatory diseases that result in impaired learning and memory, such as AD. Overall, the results indicate the possibility of applying iTBS as an add-on therapy for AD, as it exhibits antioxidant, anti-amyloidogenic and anti-inflammatory properties in an animal model of STZ-induced sAD.

**Keywords:** Alzheimer's disease, Streptozotocin, iTBS, glia, oxidative stress, behavior

# САДРЖАЈ

|   |    |
|---|----|
| I УВОД.....   | 1  |
| I 1. АЛЦХАЈМЕРОВА БОЛЕСТ .....  | 1  |
| 1.1. Клиничка слика .....   | 1  |
| 1.2. Фактори ризика .....   | 2  |
| 1.3. Хистопатолошке промене .....   | 3  |
| 1.3.4. Амилоидогенеза .....   | 5  |
| I 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ СПОРАДИЧНЕ АЛЦХАЈМЕРОВЕ БОЛЕСТИ<br>ИЗАЗВАН СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ..... | 8  |
| I 3. ОКСИДАТИВНИ СТРЕС .....  | 11 |
| 3.1. Реактивне врсте кисеоника и азота .....  | 11 |
| 3.2. Антиоксидативни систем .....   | 12 |
| 3.3. Оксидативна модификација биомолекула.....  | 14 |
| 3.4. Активација гена као одговор на оксидативни стрес.....                                  | 14 |
| 3.4. Улога оксидативног стреса у патогенези Алцхајмерове болести .....                      | 14 |
| I 4. ТРАНСКРАНИЈАЛНА МАГНЕТНА СТИМУЛАЦИЈА У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОЈ<br>МЕДИЦИНИ .....              | 15 |
| 4.1. Историја неинвазивне мождане стимулације.....  | 15 |
| 4.2. Примена ТМС.....   | 16 |
| 4.3. Основни принципи ТМС .....   | 16 |
| 4.4. Интермитентни облик стимулације тета прасковима .....                                  | 19 |
| 4.5. Пацови као модели за проучавање ТМС .....  | 19 |
| 4.6. Молекулски механизам терапијских ефеката ТМС.....                                      | 20 |
| 4.7. Утицај ТМС на понашање.....  | 22 |
| II ХИПОТЕЗА .....   | 23 |
| III ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА .....  | 24 |
| IV МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ.....   | 25 |
| IV 1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДИЗАЈН .....  | 25 |
| 1.1. Експерименталне животиње .....   | 25 |
| 1.2. Експерименталне групе и протокол .....   | 25 |
| IV 2. СТЕРЕОТАКСИЧКА ХИРУРШКА ПРОЦЕДУРА.....  | 27 |
| IV 3. ТЕСТОВИ ПОНАШАЊА.....   | 27 |
| 3.1. Тест ротирајућег цилиндра за процену моторичких способности.....                       | 27 |
| 3.2. Тест у зракастом лавиринту са осам кракова .....                                       | 28 |
| IV 4. <i>ITBS</i> ПРОТОКОЛ .....  | 29 |
| IV 5. ХИСТОХЕМИЈА, ИМУНОХИСТОХЕМИЈА И ФЛУОРЕСЦЕНТНА<br>МИКРОСКОПИЈА.....                    | 30 |
| 5.1. Нислово (тионинско) бојење.....  | 31 |
| 5.2. Имунохистохемија .....   | 31 |
| 5.3. Имунофлуоресцентно бојење .....  | 32 |
| IV 6. ПРИПРЕМА ХОМОГЕНАТА ТКИВА И ОДРЕЂИВАЊЕ УКУПНЕ<br>КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ПРОТЕИНА.....          | 34 |
| IV 7. <i>WESTERN BLOT</i> АНАЛИЗА.....  | 34 |

|   |    |
|---|----|
| IV 8. ОДРЕЂИВАЊЕ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАТИВНОГ И НИТРОЗАТИВНОГ СТРЕСА И АНТИОКСИДАТИВНЕ ЗАШТИТЕ.....  | 35 |
| 8.1. Одређивање супероксидног анион радикала.....   | 35 |
| 8.2. Одређивање садржаја нитрита и нитрата (NO <sub>2</sub> + NO <sub>3</sub> ) у хомогенатима ткива.....                                     | 36 |
| 8.3. Одређивање концентрације тиобарбитурна киселина (TBA)-реагујућих супстанци (TBARS) у хомогенатима ткива.....                             | 37 |
| 8.4. Одређивање активности укупне супероксид дигмутазе ( <i>tSOD</i> ).....   | 37 |
| 8.5. Одређивање активности каталазе ( <i>CAT</i> ).....   | 38 |
| 8.6. Одређивање садржаја укупног глутатиона ( <i>GSH</i> ).....   | 38 |
| 8.7. Одређивање садржаја укупних сулфхидрилних група ( <i>SH</i> ).....   | 39 |
| 8.8. Одређивање нивоа активности нуклеарног фактора 2 ( <i>NRF2</i> ).....  | 39 |
| 8.9. Одређивање концентрације 8-хидрокси-2'-деоксигуаносина ( <i>8-OHdG</i> ).....  | 40 |
| 8.10. Одређивање концентрације протеина одговора на рани фактор раста 1 ( <i>EGRI</i> ).....  | 41 |
| IV 9. ОДРЕЂИВАЊЕ АМИЛОИДНИХ ПРОТЕИНА.....   | 41 |
| 9.1. Одређивање концентрације амилоидног прекурсорског протеина ( <i>APP</i> ).....   | 41 |
| 9.2. Одређивање концентрације β амилоида ( <i>Aβ<sub>1-42</sub></i> ).....  | 42 |
| IV 10. ОДРЕЂИВАЊЕ ЕКСПРЕСИЈЕ НЕУРОТРОФИЧНОГ ФАКТОРА МОЖДАНОГ ПОРЕКЛА ( <i>BDNF</i> ).....   | 42 |
| IV 11. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА РЕЗУЛТАТА.....  | 43 |
| V РЕЗУЛТАТИ.....  | 44 |
| V 1. УТИЦАЈ <i>ITBS</i> НА БИХЕЈВИОРАЛНЕ ПРОМЕНЕ НАКОН ПРИМЕНЕ СТЗ.....   | 44 |
| 1.1. Тест ротирајућег цилиндра.....   | 44 |
| 1.2. Тестови у зракастом лавиринту – валидација експерименталног модела.....  | 45 |
| 1.3. Тестови у зракастом лавиринту – испитивање ефекта <i>iTBS</i> .....  | 47 |
| V 2. УТИЦАЈ <i>ITBS</i> НА МОРФОЛОШКЕ ПРОМЕНЕ НАКОН ПРИМЕНЕ СТЗ.....  | 48 |
| 2.1. Хистохемијска анализа можданих пресека.....  | 48 |
| 2.2. Имунохистохемијске промене у селективно осетљивим структурама мозга пацова.....  | 52 |
| 2.3. Процена утицаја <i>iTBS</i> на стрептозотоцином изазване имунофлуоресцентне промене у селективно осетљивим структурама мозга пацова..... | 56 |
| V 3. УТИЦАЈ <i>ITBS</i> НА БИОХЕМИЈСКЕ ПАРАМЕТРЕ НАКОН ПРИМЕНЕ СТЗ.....   | 59 |
| 3.1. Испитивање параметара оксидативног/ нитрозативног стреса и антиоксидативне заштите.....  | 59 |
| 3.2. Испитивање амилоидних протеина.....  | 68 |
| VI ДИСКУСИЈА.....   | 73 |
| VI 1. ПРОМЕНЕ У ПОНАШАЊУ.....   | 73 |
| VI 2. ЋЕЛИЈСКЕ/ ХИСТОМОРФОЛОШКЕ ПРОМЕНЕ.....  | 75 |
| VI 3. БИОХЕМИЈСКЕ ПРОМЕНЕ.....  | 78 |
| VII ЗАКЉУЧЦИ.....   | 92 |
| VIII ЛИТЕРАТУРА.....  | 94 |

# I УВОД

## I 1. АЛЦХАЈМЕРОВА БОЛЕСТ

Немачки психијатар и неуропатолог, Алојз Алцхајмер (нем. *Aloysius Alzheimer*; 1864 – 1915.) је 1907. године први описао симптоме 51-годишње пацијенткиње Аугусте Детер оболеле од Алцхајмерове болести (АБ). Након смрти пацијенткиње, др Алцхајмер је хистолошком техником бојења сребром, микроскопски изучавао препарате мозга и приметио специфичне унутарћелијске и ванћелијске накупине данас познате као сенилни плакови и неурофибриларна клубад која представљају главна обележја ове болести. Седамдесетих година прошлог века је идентификована веза између АБ и накупљања сенилних - амилоидних плакова у мозгу, што је помогло у разумевању настанка и развоја болести.

Алцхајмерова болест је сложено, прогресивно неуродегенеративно обољење са клиничком сликом деменције и специфичним хистопатолошким променама у мозгу. Обухвата 50-60% оболелих од свих врста деменције старијих од 65 година, односно 60-70% свих деменција (1). Један је од водећих узрока смрти у старијој популацији и има значајан утицај на здравствене системе широм света. Процењује се да око 55 милиона људи широм света живи са неком врстом деменције (2) и претпоставља се да ће до 2030. године бити чак 78 милиона оболелих. Како се болест јавља много пре уочавања првих симптома, јасно је да постоји одређени број нерегистрованих случајева, те и да су реални подаци вероватно већи од процењених.

Термин „деменција“ није једна специфична болест, већ група симптома попут нарушеног памћења, понашања, размишљања и социјалних интеракција, довољно озбиљних да ометају свакодневне активности. Алцхајмерова болест је код људи старијих од 65 година најчешћи, али не и једини узрок деменције.

### 1.1. Клиничка слика

Болест настаје и до две деценије пре него што се уоче прве промене у понашању и ова фаза се означава као преклиничка, односно асимптоматска фаза.

Први симптоми се појављују готово неприметно са врло благим сметњама типа спорадичне заборавности и/или благе конфузије. Проблеми са памћењем представљају један од кључних симптома АБ. Присутне су сметње у краткорочном памћењу и радној меморији, а нарушене су и визуелно-просторне функције. У каснијем стадијуму болести нарочито је изражено оштећење функција повезаних са оријентацијом, и слабљење когнитивних функција. Као део клиничке слике, секундарно се јављају и поремећаји расположења попут депресије, апатије, анксиозности, агресије и халуцинације, као и поремећаји спавања што коначно доводи до смањење самосталности и функционалности пацијента.

Испољавање симптома, њихов ток и редослед јављања су различити код сваког пацијента, али ипак постоје нека типична обележја која рано могу да укажу на АБ. Препознавање болести у раним фазама је веома важно за успоравање прогресије болести и побољшање квалитета живота.



## 1.2. Фактори ризика

Према узроцима, АБ се може поделити у две категорије:

- спорадични облик (сАБ) - најчешћи облик АБ, који се јавља код људи без јасних генетичких фактора ризика;
- наследни облик - јавља се када постоји наследна мутација која доводи до развоја АБ.

Иако тачан узрок и прецизан механизам развоја болести нису у потпуности разјашњени, препознати су бројни фактори ризика који доприносе развоју ове болести. Фактори су грубо подељени на немодификујуће попут старости и наследних фактора и модификујуће чијом изменом можемо утицати до одређене мере на развој болести.

Старост несумњиво представља највећи фактор ризика за настанак ове болести. Сама АБ не представља део физиолошког процеса старења и старост није довољан разлог за појаву АБ (3). Ризик оболевања од АБ расте са порастом старосне доби, односно преваленца се повећава са 1% код субјеката старости 65–69 година на ~30% код особа старијих од 85 година (4). На основу година старости у којима се јавља, АБ може бити са раним почетком (редак облик са око 1 – 6% случајева, од којих је већина њих наследна и јавља се од 30 до 60 или 65 година старости). Други облик је АБ са касним почетком, који је чешћи и јавља се након 65. године живота.

Наследни фактори такође имају веома битну улогу у развоју болести. Особе које имају блиске сроднике са дијагностикованом АБ имају већи ризик од развоја ове болести. Иако је поменуто да углавном оболевају старије особе, у 5-10% случајева, болест се може јавити и пре 60. године живота и тада се ради о типу АБ са раним почетком и најчешће се наслеђује аутозомно-доминантно. Откривено је неколико мутација на хромозомима које доводе до болести: мутације у гену за амилоидни прекурсорски протеин (енг. *Amyloid precursor protein, APP*) (хромозом 21), пресенилин 1 (хромозом 14), пресенилин 2 (хромозом 1), полиморфизам гена *APOE4* (хромозом 19), итд.

Модификујући фактори ризика су променљиви и према неким подацима, њиховим прилагођавањем се може спречити или одложити 40% случајева деменције (5). У ову групу спадају: неадекватна исхрана, недостатак физичке активности, трауматске повреде главе, кардиоваскуларне болести, хипертензија, хиперхолестеролемија, злоупотреба алкохола, пушење, гојазност, психолошки фактори попут високог нивоа стреса, депресија, анксиозност и поремећаји спавања. Нижи образовни ниво се сматра једним од фактора ризика и наводи се да се код образованих особа, знаци деменције касније испољавају у односу на особе са нижим степеном образовања (6). Такође, наводи се да жене имају већи ризик од развоја АБ у односу на мушкарце.

Важно је напоменути да АБ настаје као последица интеракције великог броја поменутих фактора. Присуство једног или више фактора ризика не значи нужно да ће особа развити АБ, већ само повећава вероватноћу настанка болести. Са друге стране, смањење фактора ризика може бити корисно у превенцији болести или успоравању напредовања њеног клиничког тока.

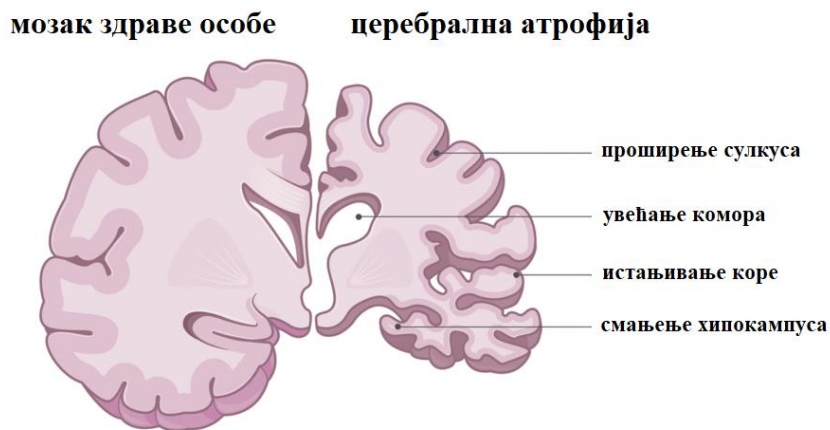
### 1.3. Хистопатолошке промене

Мождане структуре које су одговорне за памћење су пречеона мождана кора (лат. *prefrontal cortex*), хипокампус (лат. *hippocampus*), мали мозак (лат. *cerebellum*) и бадемаста једра (лат. *amygdale*). Ове структуре бивају оштећене код пацијената са АБ и пропорционално степену оштећења, јављају се промене у понашању, односно поремећаји учења и памћења.

Микроскопском анализом ткивних исечака пацијената оболелих од АБ узетих *post mortem* уочавају се бројне морфолошке промене од којих су најзначајније присуство накупина амилоида бета ( $A\beta$ ) – сенилни плакови, хиперфосфорилисаних тау протеина - неурофибриларна клубад, оштећење и губитак синапси, неурона и активација ћелија глије.

#### 1.3.1. Макроскопске промене

На макроплану уочава се смањење запремине мозга, односно атрофија мождане масе, увећање комора упоредо са проширеним браздама и истањеним вијугама (Слика I 1). Међутим, ове промене су присутне и код сенилне атрофије мозга веома старих особа. Ипак, код АБ хипотрофија се дешава у специфичним регионима мозга и најчешће се уочава у пределу хипокампуса, базалних ганглија, енторијалне коре и бадемастих једара, тј. оних структура које су одговорне за процесе учења, памћења и емоција. Атрофија почиње у средишњем слепоочном режњу (лат. *lobus temporalis medius*) и фузиформној вијуги (лат. *gyrus fusiformis*), затим се шири на задњи слепоочни режањ (лат. *lobus temporalis posterior*) и темени режањ (лат. *lobus parietalis*), и на крају захвата и чеони режањ (лат. *lobus frontalis*) (7). Поред сиве масе, дегенеративне промене се уочавају и у белој маси, која се налази у непосредној близини мождане коре код оболелих (8).



Слика I 1. Атрофија мождане масе код АЛЦХАјмерове болести

Атрофија мождане масе настаје као последица оштећења неуронских веза, губитка нервних и глија ћелија. Неуродегенерација код АБ обухвата низ сложених промена у мозгу које укључују дисфункцију митохондрија, оксидативни/ нитрозативни стрес, активирање астроцита и микроглије и накупљање амилоидних плакова.

### 1.3.2. Микроглија у АЛЦХАЈМЕРОВОЈ БОЛЕСТИ

Ћелије микроглије су имунокомпетентне ћелије централног нервног система (ЦНС), које рано током ембриогенезе насељавају моздано ткиво и имају улогу у одбрани од штетних спољних утицаја, одржавању хомеостазе, као и у развојном обликовању неуронских кругова уклањањем нежељених неурона и синапси (9, 10). Микроглија је важна компонента у развоју неуродегенеративних болести, укључујући и АБ. До сада је описана улога микроглије у модулацији неуродегенерације са функцијама ограниченим на неуроинфламацију и ослобађање неуротоксичних молекула. Међутим, новији подаци показују директну улогу микроглије у неуродегенерацији код АБ промовисањем фагоцитозе неуронских, посебно синаптичких структура (11).

У мозгу оболелих од АБ уочава се хетерогеност микроглије у смислу функције и фенотипа. Морфологија микроглијских ћелија варира у зависности од просторног положаја и стадијума болести. Тако је показано да микроглија у близини амилоидног плака пролази кроз изразите морфолошке и електрофизиолошке промене, док микроглија удаљена од плака показује само мање промене током времена (12). Такође, фенотипске промене у микроглији, укључујући промене у морфологији и функцији, повезане су са прогресијом болести (13, 14).

Према се микроглија у мозгу може активирати и независно од амилоида, активацију микроглијских ћелија код пацијената са АБ покреће присуство патолошких протеина у мозгу, укључујући и  $\beta$ -амилоидне пептиде (11). Активација микроглије показана је код пацијената са благим когнитивним оштећењем (15) као и на анималним моделима АБ у фази пре појаве првих плака (16), указујући на неуроинфламацију као рани догађај у овој болести (17).

Активирана микроглија може имати заштитну улогу, али са друге стране може имати утицаја и на процес напредовања болести (18). Неуропротективна улога микроглије покренута акутном неуронском повредом функционише као прва линија одбране у репарацији оштећеног нервног ткива како би се успоставила хомеостаза. Заштитна микроглијска улога се односи и на регулацију  $A\beta$  нивоа у мозгу, односно у уклањању вишка  $A\beta$  из организма (19, 20). Међутим, претпоставља се да промена функције микроглије повезане са старењем може довести до смањене способности ефикасног уклањања патолошких протеина, што доводи до њиховог нагомилавања. Ослабљена неуропротекција подстиче неуродегенерацију код АБ, али и других неуродегенеративних болести повезаних са старењем (21). Такође, прекомерна и нерегулисана активност микроглије може довести до оштећења неурона. На проинфламацијске „окидаче“ микроглија реагује производњом слободних радикала, цитокина и других медијатора који даље подстичу запаљенски процес у нервном ткиву. Са друге стране, сигнали из оштећених неурона, такође активирају микроглију и настаје самообнављајући (континуирани) циклус неуротоксичне активације микроглије праћен оштећењем и смрћу неурона, који се назива реактивна микроглиоза. Претпоставља се да овај механизам може бити у основи прогресивне природе АБ, али и других неуродегенеративних болести (18).

### 1.3.3. Астроцити у Алцхајмеровој болести

Астроцити су хетерогена група глијских ћелија са различитим фенотиповима и функцијама специфичним за њихово регионално порекло (22, 23). Представљају структурне, метаболичке и потпорне компоненте нервног ткива које изграђују крвно-мождану баријеру, регулишу јонску и хомеостазу воде, штите неуроне од оксидативног стреса, одржавају хомеостазу у трипартитној синапси и контролишу неуронску сигнализацију. Контролом синаптичке активности, астроцити су одговорни и за регулацију когнитивних функција (24). Астроцитна дисфункција је део патологије неуродегенеративних болести, укључујући и АБ (25).

На мембранама астроцита се физиолошки налазе транспортери ексцитаторних аминокиселина (енг. *Excitatory Amino Acid Transporter; EAAT*), који преузимају неуротрансмитере (глутамат и *GABA*) из синаптичке пукотине. Брзим уклањањем трансмитера из синапсе завршава се синаптичка трансмисија, онемогућава дифузија трансмитера ван синапсе, одржава нормална нервна надражљивост и спречава испољавање ексцитотоксичности. Међутим, код особа оболелих од АБ, као и на експерименталним моделима ове болести показана је редукција нивоа информационе рибонуклеинске киселине (иРНК) за *EAAT1* (енг. *Glutamate Aspartate Transporter; GLAST*) и *EAAT2* (енг. *Glutamate Transporter; GLT-1*) (26).

Неуронска смрт и/или оштећење неурона, као и акумулација  $A\beta$  заједно са проинфламацијским цитокинима ослобођеним од стране активираних микроглије доводи до функцијске и морфолошке активације астроцита, која се означава као реактивна астроглиоза (27, 28).

Активирани астроцити могу имати различите ефекте на патогенезу АБ (29). Овакви астроцити ослобађају цитокине, хемокине, факторе раста и глиотрансмитере (30), затим факторе неопходне за раст аксона и формирање синаптичких веза након повреде (27, 31). Они учествују у разградњи и уклањању  $A\beta$  што може бити корисно у почетној фази оштећења, односно спречавању даљег оштећења (32). Такође, антиоксидативни одговор у астроцитима подразумева и уклањање слободних радикала које производе неурони и други типови ћелија, чиме се спречава оксидативно оштећење ЦНС-а (33).

Супротно, активирани астроцити могу деловати као један од главних извора штетних реактивних врста кисеоника (РВК) и азота (РВА) који могу покренути активацију микроглије или директно изазвати оштећење неурона (33). Астроглиоза и повећана неуроинфламација могу даље утицати на функцију и интегритет крвно-мождане баријере, што може довести до отежаног уклањања штетних материја и додатних патолошких накупина у мозгу.

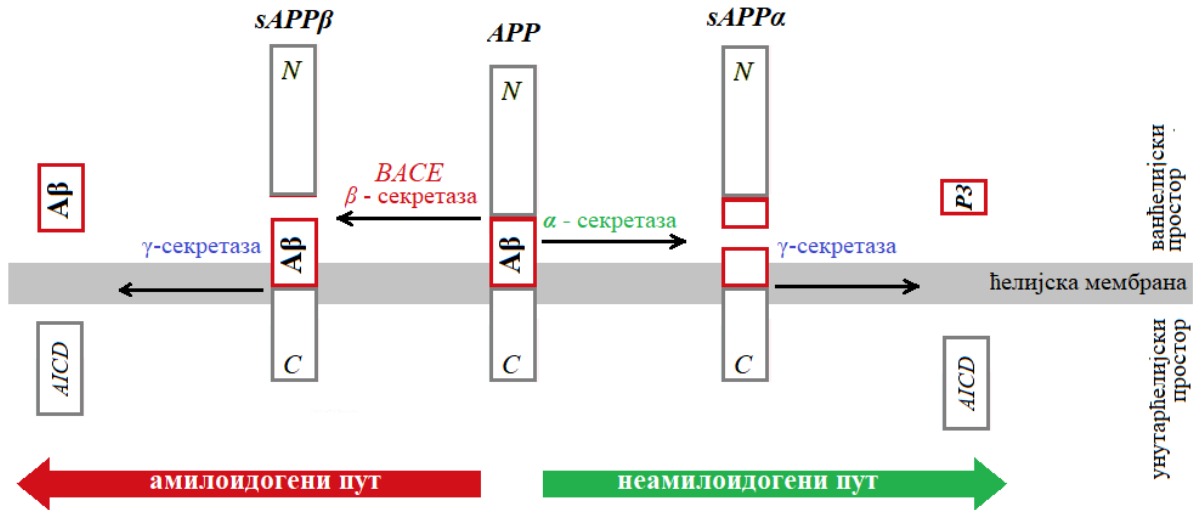
### 1.3.4. Амилоидогенеза

Микроскопском анализом ткивних исечака узетих *post mortem* од пацијената оболелих од АБ уочава се присуство сенилних плакова, односно депозита  $A\beta$  у ванћелијском простору, што представља један од кључних фактора у патогенези АБ. Ипак, присуство  $A\beta$

депозита није искључиво карактеристично за АБ, већ се може јавити и у току физиолошког процеса старења као и неких других деменција.

Од бројних хипотеза о настанку АБ, најприсутнија је амилоидна хипотеза која се заснива на утицају  $A\beta$  депозита. Према овој хипотези, кључни догађај у развоју АБ је оштећен метаболизам  $A\beta$  протеина у мозгу који покреће каскаду догађаја и резултира неуродегенерацијом. У физиолошким условима  $A\beta$  протеини нормално су присутни у мозгу и редовно се уклањају, док код АБ долази до накупљања  $A\beta$  и стварања амилоидних плакова између неурона, што последично нарушава функционисање мозга. Додатно, амилоидни плакови подстичу запаљенски процес који даље оштеђује неуроне. Према овој хипотези, повећање продукције  $A\beta$  и/или смањење способности организма да их уклони доводи до накупљања ових протеина и настанка амилоидних плакова.

Амилоид бета настаје протеолитичком обрадом *APP*, трансмембранског гликопротеина кодираног геном на 21. хромозому (34). Предоминантна изоформа *APP* у ЦНС-у састоји се од 695 аминокиселина и има улогу у формирању синапси, утиче на дуготрајну потенцијацију и процесе учења и памћења (34). Синтетише се у ендоплазматичном ретикулуму где се врши гликозилација, а затим транспортује до Голџијевог комплекса за додатно паковање у транспортне везикуле које га испоручују до плазма мембране. Овај интегрални протеин има дужи, ванћелијски *N*-терминални део и краћи, унутарћелијски *C*-терминални домен. Ензими који секу *APP* су  $\alpha$ - или  $\beta$ -секретаза (познат и као енг. *Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme - BACE*) и касније  $\gamma$ -секретаза (35). У зависности од ензима укључених у протеолитичку обраду *APP*, разликују се амилоидогени и неамилоидогени пут разградње *APP* (Слика 1 2.). У физиолошким условима одвија се неамилоидогени пут обраде протеина деловањем  $\alpha$ - и  $\gamma$ -секретазе на ектодомен *APP*, при чему настаје фрагмент *APP* са унутарћелијским доменом (енг. *APP-intracellular domain - AICD*) и растворљиви фрагмент *APP* са ванћелијским доменом (енг. *Soluble amyloid precursor protein- $\alpha$  - sAPP $\alpha$* ). Показано је да *sAPP $\alpha$*  посредује у већини познатих неуропротективних и неуротрофичних ефеката (36, 37). Са друге стране, активирањем  $\beta$ -секретазе почиње амилоидогени пут који доводи до настанка *sAPP $\beta$*  (енг. *Soluble amyloid precursor protein- $\beta$  - sAPP $\beta$* ), који даље под дејством  $\gamma$ -секретазе производи  $A\beta$  који се састоји из дела трансмембранског домена и кратког ванћелијског фрагмента. Комплекс  $\gamma$ -секретазе је неопходан за коначно стварање  $A\beta$  пептида.



Слика I 2. Амилоидогени и неамилоидогени пут обраде амилоидног прекурсорског протеина (APP)

Пептиди  $A\beta$  представљају фрагменте различите дужине од 38 до 43 аминокиселине (38), који могу бити укључени у транспорт холестерола кроз мембрану или се могу транслоцирати у једру где учествују у генској регулацији, док одређена група учествује у стварању плака, токсичних за активност неурона. У формирању плака учествују  $A\beta_{40}$  и  $A\beta_{42}$ , при чему је  $A\beta_{42}$  токсичнији облик и склонији таложењу, али уједно и ређи у односу на  $A\beta_{40}$ . Сматра се да  $A\beta$  делује токсично на неуроне у форми плака и у солубилном облику (39) и да степен токсичности зависи од конформационог стања  $A\beta$  (40). Оштећење неурона може бити директно када се омета неуронска комуникација или индиректно када активисане глија ћелије доводе до покретања запаљенских процеса (неуроинфламације) и стварања слободних радикала. Даље,  $A\beta$  подстиче настанак оксидативног стреса и испољавања екситотоксичности услед накупљања калцијума у ћелијама што доприноси смањењу флуидности мембрана услед редуковања енергетских залиха, индукује промену цитоскелета, нарушава хомеостазу метала и доводи до синаптичке дисфункције и неуродегенерације.

Према амилоидној хипотези, агрегација  $A\beta$  представља један од почетних догађаја патофизиолошке каскаде у АБ, с обзиром да претходи другим патолошким променама и клиничким симптомима. Чињеницу да присуство  $A\beta$  није главни узрок неуротоксичности потврђују резултати клиничких студија, који показују да постоје особе са потврђеним амилоидним депозитима без поремећаја когнитивних функција, као и пацијенти са дијагнозом АБ код којих је број амилоидних депозита веома мали (41). Такође, већина експерименталних лекова који циљају  $A\beta$  нису довели до очекиваног ублажавања симптома болести што наводи истраживаче на мишљење да  $A\beta$  није једини узрочник настанка обољења (42, 43). Такође постоје и мишљења да је постојање плака само компензаторни механизам и последица, а не узрок болести (44).

### 1.3.5. Метаболичке промене

Метаболички фактори који се повезују са патогенезом АБ укључују оксидативни стрес, запаљенске процесе, промене у метаболизму протеина и липида, смањену активност митохондрија и настанак централне инсулинске резистенције, па се АБ може класификовати и као метаболички поремећај (45).

Код пацијената са АБ је смањена потрошња глукозе у мозгу и нарушена инсулинска сигнализација што се сматра обликом инсулинске резистенције. Инсулин регулише метаболизам глукозе у мозгу и укупни енергетски метаболизам неурона, одржава функционалност неурона и синапси кроз подстицај раста неурона (посебно дендритских трнића), а утиче и на промет неуротрансмитера кроз њихово ослобађање и поновно преузимање (46). Поред тога, инсулин има улогу у уклањању  $A\beta$  пептида и фосфорилацији тау протеина (46).

Највећа густина инсулинских рецептора налази се у хипокампусу – možданом региону одговорном за учење и памћење. Густина и осетљивост инсулинских рецептора се током старења смањује, а густина рецептора за фактор раста сличан инсулину (енг. *Insulin Growth Factor I – IGFI*) се повећава, указујући на измењену инсулинску сигнализацију током старења, што је слично когнитивном пропадању и настанку неуродегенеративних обољења (46).

Ово упућује на значај дисрегулације функције инсулина који може допринети неуродегенерацији. Све већи број студија указује на повезаност између дијабетеса и АБ и указује на могуће заједничке ћелијске и молекулске механизме ова два обољења, а неки истраживачи за АБ чак користе и термин „дијабетес типа III“ (47).

## I 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ СПОРАДИЧНЕ АЛЦХАЈМЕРОВЕ БОЛЕСТИ ИЗАЗВАН СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ

Због ограничених могућности испитивања на људима, за детаљнији увид у патогенезу АБ и ефекте потенцијалних терапијских приступа, користе се експериментални модели. Имајући у виду сложену природу АБ, тешко је успоставити модел који би верно опонашао сваки аспект ове болести код људи. Само мали проценат АБ је по типу наследни облик и у овом случају је коришћење трансгених модела који се заснивају на манипулацији гена у великој мери оправдан. Ипак, највећи број случајева АБ је спорадичног типа на које мање јасно утиче једна мутација гена и стога је мало вероватно да ће трансгени модели бити репрезентативни за спорадични тип АБ (47). Етиологија сАБ је непозната, али је идентификован велики број фактора ризика који повећавају шансе за прогресију ове болести. Имајући у виду присуство инсулина и инсулинских рецептора у мозгу, као и нарушену инсулинску сигнализацију у сАБ (48) развијен је експериментални модел на пацову применом стрептозотоцина (СТЗ).

Стрептозотоцин је природно хемијско једињење (2-деокси-2-(3-(метил-3-нитрозоуреидо)-Д-глукопираноза) изоловано из грам - позитивних бактерија *Streptomyces achromogenes*, првенствено коришћено као цитостатик у терапији карцинома панкреаса. У биолошким истраживањима користи се као агенс који интраперитонеалном апликацијом

може да изазове инсулин-зависни *diabetes mellitus* код експерименталних животиња (49), док интрацеребровентрикуларна (ицв) апликација СТЗ доводи до промена сличним онима које се јављају код пацијената са сАБ (47, 50, 51). Промене настале ицв применом СТЗ се уочавају на три различита нивоа:

- 1) биохемијске промене: смањење метаболизма глукозе у специфичним регионима мозга, редукција холинергичке трансмисије и повећање маркера оксидативног стреса;
- 2) морфолошке промене: губитак неурона у хипокампусу и повезаним можданим структурама уз пратећу астроглиозу и неуроинфламацију;
- 3) бихевиоралне промене: оштећење памћења и учења.

Иако није у потпуности разјашњен, претпоставља се да је централни механизам дејства СТЗ сличан оном на периферији где СТЗ улази у ћелију преко транспортера глукозе 2 (енг. *glucose transporter 2; GLUT2*) (52). Периферна апликација СТЗ у  $\beta$ -ћелијама преко алкилације ДНК доводи до исцрпљивања ћелијског *NAD+* и *ATP* (49). Смањени нивои *ATP* се такође уочавају након ицв примене СТЗ (53).

Глукоза је главни извор енергије у мозгу, а неометани метаболизам глукозе је од изузетног значаја за нормално функционисање овог органа. Експериментални подаци показују да ицв примена СТЗ узрокује смањену искористљивост глукозе за 44 % након три недеље (54) и чак до 30 % након шест недеља у специфичним регионима мозга, посебно у чеоној кори и хипокампусу (55).

Функционалност централне холинергичке трансмисије је од изузетног значаја за процесе учења и памћења. Измењена холинергичка неуротрансмисија се региструје код сАБ као и након ицв примене СТЗ код пацова. Значајно повећање активности ацетилхолинестеразе, ензима одговорног за брзу деградацију ацетилхолина, пронађено је од једне до три недеље након ицв давања СТЗ код одраслих пацова (56).

Хемијска природа СТЗ утиче на стварање слободних радикала, што доводи до оксидативног/нитрозативног стреса (57), показујући сличност са стањем оксидативног стреса које се уочава на *post mortem* узорцима код пацијената са сАБ (58). Показано је да СТЗ узрокује оксидативно оштећење стварањем РВК и РВА, пероксидацијом липида, смањењем нивоа глутатиона (*GSH*) и редукцијом активности ензима антиоксидативне заштите у мозгу пацова (59).

Морфолошке промене у мозгу се уочавају већ недељу дана након ицв примене СТЗ (60). Повећање броја *GFAP+* ћелија (енг. *glial fibrillary acidic protein GFAP*) се региструје у пери- и паравентрикуларним регионима, укључујући форникс и фимбрију, стријатум и хипокампус (60, 61) након ицв примене СТЗ. Апликацијом ицв СТЗ долази до активације глија ћелија, неуроинфламације и неуродегенерације што доводи до атрофије специфичних можданих региона и повећане запремине вентрикуларног система (62).

Након ицв давања СТЗ, животиње показују прогресивно слабљење функција које су зависне од хипокампуса, као што су просторно учење и памћење (63). Промене се примећују већ две недеље након примене СТЗ и одржавају се и до 12 недеља, што је најдужи забележени период посматрања до сада (53, 60; 64, 65). Занимљиво је да се реактивна глиоза и оксидативни стрес уочавају већ недељу дана након ицв давања СТЗ и они претходе



когнитивном дефициту који се бележи три недеље након апликације СТЗ (57, 60). У истом периоду посматрања, у možданој кори и хипокампусу нису откривени знаци оштећења неурона или смањења специфичних холинергичких маркера (60).

Прецизан механизам којим ицв примена СТЗ доводи до оштећења когнитивних функција није познат, али се претпоставља да кумулативни ефекат енергетског дефицита, смањене активности холин ацетилтрансферазе и синаптичке дисфункције, индукција оксидативног стреса, неуроинфламација и директна неуротоксична оштећења форникса, хипокампуса и перивентрикуларних структура (селективна неуродегенерација) могу чинити биолошку основу за значајно смањење капацитета учења и памћења уоченог на овом експерименталном моделу (50, 51, 63, 64, 66 - 69)

Код одраслих пацова ицв давање СТЗ изазива прогресивне промене у инсулинском систему, укључујући инсулинске рецепторе и нисходну сигналну каскаду у специфичним регионима мозга (64). Модел болести изазван ицв применом СТЗ пружа доказе о повезаности централне инсулинске резистенције са  $A\beta$  и тау патологијом која је присутна у АБ (64, 70). Заправо, механизам дејства СТЗ заснива се на изазивању централне инсулинске резистенције за коју је доказано да доводи до оксидативног стреса и инфламације што доприноси развоју амилоидне и тау патологије (71). Претпоставља се да је метаболизам *APP* под контролом инсулинске сигнализације и инсулинског рецептора који је спрегнут са активношћу тирозин киназе (72, 73). Показано је такође да инсулин регулише фосфорилацију тау протеина путем регулације активности гликоген синтаза киназе-3 (74, 75). Патолошка агрегација  $A\beta$  у облику церебралне амилоидне ангиопатије уочава се у менингеалним капиларима најраније три месеца након ицв примене СТЗ и присутна је и након шест до девет месеци после апликације СТЗ у кортикалним и менингеалним крвним судовима пацова (76). Ови резултати пружају додатне доказе о сличности анималног модела са ицв апликацијом СТЗ и патофизиологијом код пацијената са сАБ.

Стрептозотонин узрокује патологију сличну сАБ, што оправдава коришћење овог експерименталног модела за испитивање ефеката терапијских приступа на одређене патолошке механизме сАБ. Ипак експериментални модел има и нека ограничења јер не рефлектује све карактеристике хумане АБ и није савршен одраз људске патологије. Такође, поступак примене СТЗ-а може имати нуспојаве на здравље животиња које могу утицати на резултате истраживања. Стога, пре коришћења овог модела, пажљиво се разматрају све предности и недостаци како би модел био адекватан за истраживање које треба да се спроведе. Истраживања на животињским моделима имају важну улогу у разумевању основних механизма и развоју терапије за одређену болест, али екстраполација резултата на хуману популацију увек захтева додатна експериментална, претклиничка истраживања, као и спровођење клиничких студија. На основу познатих ефеката СТЗ, предложени анимални модел у овом истраживању представља добру основу за испитивање утицаја изабране терапије на антиоксидативни, неуроинфламацијски и амилоидогени статус специфичних možданих региона, као и на учење и памћење.

### I 3. OKSIDATIVNI STRES

Оксидативни стрес је резултат нарушене равнотеже између антиоксидативних и прооксидативних врста што доводи до поремећене хомеостазе ћелије. Редокс дисбаланс има значајну улогу у процесу старења, али и бројних неуродегенеративних болести, укључујући и АБ. Прооксидативним врстама се сматрају различити радикалски и нерадикалски облици РВК и РВА, док антиоксидативне врсте представљају групу антиоксиданата егзогеног или ендогеног порекла (77).

Слободни радикали представљају молекуле, јоне или атоме који имају један или више неспарених електрона у својој структури што представља узрок високе реактивности јер показују тежњу да спаре своје неспарене електроне. Неспарени електрони у спољашњој орбитали одговорни су за реактивност свих радикалских врста кисеоника. У реакцији са донором електрона, слободни радикали добијају електрон (редукују се), а супстрат губи електрон (оксидује се) чиме настаје секундарни слободни радикал, односно отпочиње ланац радикалских реакција (78).

Одређена количина слободних радикала створена током нормалне метаболичке функције ћелије има значајну улогу у ензимологији и ћелијској сигнализацији (79). Међутим, уколико њихова производња измакне контроли, постају веома реактивни и долази до померања унутарћелијског редокс стања, затим оксидативне модификације биомолекула, односно нарушавања физиолошке функције протеина, нуклеинских киселина, липида и угљених хидрата, као и активације гена.

#### 3.1. Реактивне врсте кисеоника и азота

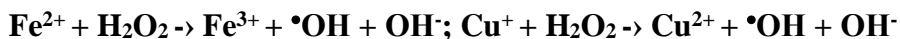
Више од 95 %  $O_2$  унетог у ћелију пролази кроз комплетну редукцију до  $H_2O$ , док парцијалној редукцији подлеже само 1-5%  $O_2$  и трансформише се у РВК. Једноелектронском редукцијом  $O_2$  настаје супероксид анјон радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), двоелектронском водоник пероксид ( $H_2O_2$ ), а троелектронском хидроксил радикал ( $OH^{\cdot}$ ) (80).

Ензимски комплекс *NADPH* (енг. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) оксидаза у активираним фагоцитним ћелијама редукује молекулски кисеоник стварајући  $O_2^{\cdot-}$  (81). Такође, и у другим, нефагоцитним ћелијама постоји низ изоформи *NADPH* оксидаза које стварају  $O_2^{\cdot-}$  као одговор на различите цитокине и факторе раста (82). Премда и сам испољава деструктивне ефекте, његова токсичност се повећава у реакцији са прелазим металима (попут гвожђа; Fe) или другим слободним радикалима ( $^{\cdot}NO$ ) што доводи до настанка нових реактивних врста ( $H_2O_2$ ,  $^{\cdot}OH$ ,  $OONO^{\cdot}$ ) када се може индуковати пероксидација липида, деполимеризација полисахарида, оштећење ензима и ћелијских мембрана, поремећај синтезе ДНК и транскрипције РНК што подстиче процесе канцерогенезе (83).

Премда  $H_2O_2$  није слободни радикал (нема неспарених електрона), он представља најстабилнији облик РВК. Највећи део  $H_2O_2$  настаје дизмутацијом  $O_2^{\cdot-}$ . Учествоје у физиолошким процесима миграције, пролиферације и диференцијације, а има и важну улогу у ћелијској сигнализацији (84). У мањим концентрацијама  $H_2O_2$  оштећује протеине ћелијске мембране, у нешто већим концентрацијама оштећује ДНК, док уласком у ћелију може

инхибирати и синтезу *ATP*. Водоник пероксид може директно довести до оксидације сулфхидрилних група (*SH*) протеина и иницирати пероксидацију мембранских липида. Поред тога,  $\text{H}_2\text{O}_2$  има способност да реагује са делимично редукованим јонима метала ( $\text{Fe}^{2+}$  или  $\text{Cu}^+$ ) у *Fenton*-овој реакцији чиме доводи до формирања  $\text{OH}^\bullet$ .

Хидроксил радикал ( $\bullet\text{OH}$ ) је веома токсичан, високо реактиван радикал који настаје у *Fenton*-овој реакцији:



и *Haber-Weiss*-овој реакцији између  $\text{O}_2^{\bullet-}$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  у присуству јона метала ( $^{2+}\text{Fe}$  и  $^{3+}\text{Fe}$ ):



Хидроксил радикал је присутан кратко у ћелији, има полуживот само око 10 секунди (s), тако да реагује близу места формирања, стварајући секундарне реактивне радикале и узрокујући велика оштећења ћелија. Реагује са скоро свим молекулима у организму, са фосфолипидима, шећерима, ДНК базама, аминокиселинама и органским киселинама и представља један од најснажнијих активатора липидне пероксидације (84). Штетан утицај  $\bullet\text{OH}$  се смањује реакцијом између два  $\bullet\text{OH}$  при чему настаје  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

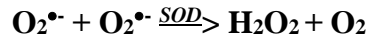
Реактивне врсте азота представљају групу једињења која потичу од азот монооксида и имају висок оксидациони потенцијал. Главни представник РВА јесте управо  $\bullet\text{NO}$ , слободни радикал који настаје у ћелијама под дејством породице ензима азот оксид синтазе (енг. *nitric oxide synthase*, *NOS*), *NADPH* и више редокс-кофактора. Реактивност  $\bullet\text{NO}$  доводи до стварања других РВА, попут пероксинитрита ( $\text{ONOO}^\bullet$ ), азот диоксида ( $\text{NO}_2^\bullet$ ), азот триоксида ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) и азот тетроксида ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ). Биолошки извор  $\bullet\text{NO}$  може бити и редукација нитрата и нитрита. У ЦНС-у  $\bullet\text{NO}$  има улогу у интернеуронској комуникацији, интраћелијској сигнализацији и ослобађању неуротрансмитера што подстиче процесе неуропластичности. Ихибицијом активности многих ензима, веће количине  $\bullet\text{NO}$  могу имати штетно дејство, покренути липидну пероксидацију или изменити структуру ДНК. Са друге стране, мање количине могу бити цитопротективне у смислу да  $\bullet\text{NO}$  делује као антиоксидант, утиче на индукцију и активацију гена, апоптозу, стимулацију имунског одговора, неуротрансмисију или релаксацију васкуларне мускулатуре (85).

### 3.2. Антиоксидативни систем

Антиоксидативни систем чине ензимска компонента, где спадају *SOD* (енг. *superoxide dismutase*, *SOD*), каталаза (*CAT*), ензими глутатионског редокс циклуса (глутатион пероксидаза (*GSH-Px*), глутатион редуктаза (*GR*) и глутатион-S-трансфераза) и неензимска компонента коју чине липосолубилне супстанце попут  $\alpha$ -токоферола (витамин Е), ретинола (витамин А),  $\beta$ -каротена (провитамин А), убихинона (коензим Q10) и хидросолубилне супстанце попут *GSH*, цистеина, хистидина, лактоферина, биливердина, и Л-аскорбинске киселине (витамин Ц) (85).

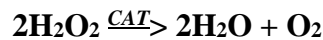
Супероксид дизмутаза су група металоензима који катализују дизмутацију  $\text{O}_2^{\bullet-}$  у молекулски кисеоник и водоник пероксид. Неутрализација штетног дејства  $\text{O}_2^{\bullet-}$  се дешава

спонтано у киселој средини реакцијом између два  $O_2^{\bullet-}$  при чему такође настаје  $H_2O_2$ , док при физиолошкој  $pH$  мора бити катализована ензимом *SOD*:



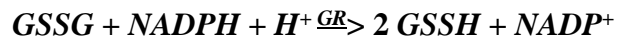
Како  $O_2^{\bullet-}$  не пролази биолошке мембране, он мора бити неутрализован у компартманима где је и настао. У зависности од металног кофактора у активном центру ензима, као и од тога где се налазе, код људи се разликују три облика овог ензима: манган *SOD* (*MnSOD*) у митохондријама, бакар цинк *SOD* (*CuZnSOD*) у цитосолу и *ECSOD* у екстрацелуларним течностима. *MnSOD* се може транспортовати и у ванћелијски простор, тако да штити целу ћелију, односно обе стране мембране од липидне пероксидације.

Каталаза је ензим који катализује реакцију трансформације  $H_2O_2$ , настлог дизмутацијом  $O_2^{\bullet-}$ , до воде и молекулског кисеоника:



Каталаза највећу активност испољава у условима високе производње  $H_2O_2$ . Као последица различитих ензимских реакција у пероксизомима, настаје велика количина  $H_2O_2$ , па се у њима и налази највећа количина *CAT* чија улога је да заштити ћелију од оксидативних оштећења. Каталаза се налази у цитосолу и митохондријама. Заједно са *CAT*, изоензими глутатион пероксидазе компетитивно конкуришу за  $H_2O_2$  као супстрат. Међутим, показано је да су *GSH-Px* ефикасније у неутрализацији мањих количина  $H_2O_2$ , док је *CAT* активнија у присуству већих концентрација  $H_2O_2$  (85).

У физиолошким условима, највећи део глутатиона се налази у редукованом облику (*GSH*), а само 1% у оксидованом облику (*GSSG*). У условима оксидативног стреса, поменути однос бива нарушен, при чему се *GSH* смањује, а количина потенцијално токсичног *GSSG* повећава. Недостатак *GSH* може бити надокнађен *de novo* синтезом или у већем обиму редукацијом *GSSG* у *GSH* уз учешће *NADPH* као редукујућег фактора, а у присуству ензима *GR*. Заправо, *GR* је задужена за одржавање горе поменутог односа између *GSH* и *GSSG*. Сам *GSH* није јак антиоксидант, већ се његова важност огледа у одржавању нормалне функције *GSH*-зависних ензима значајних у одбрани од штетног дејства РБК (85).



Свако органско једињење које за атом угљеника има везану *SH* групу, назива се тиол. У живом систему, важну улогу има функционална *SH* група везана за аминокиселину цистеин која је градивни део многих протеина. Модификација *SH* групе кроз различите редокс реакције доводи до функционалног одговора протеина. Тако промена конформације протеина утиче на промену ензимске активности, на везивање лиганда за рецепторе, на активност транспортера или изазива међупротеинску реакцију и чак деградацију протеина. Како већина протеина садржи најмање једну аминокиселину подложну реверзибилној оксидацији, јасно је да хомостаза у великој мери зависи од редокс статуса, а детекција *SH* група може послужити као добар маркер одређивања степена оксидативног стреса (85).

### 3.3. Оксидативна модификација биомолекула

Липидна пероксидација представља процес у коме слободни радикали утичу на структуру полинезасићених масних киселина (енг. *polyunsaturated fatty acids* - *PUFA*) у биолошким мембранама чији су производи реакције такође реактивни и покрећу ланчани процес оксидације масних киселина. Малондиалдехид (*MDA*) је један од производа липидне пероксидације. Изузетно је реактиван и може оштетити ћелијске мембране, протеине и друге биомолекуле и довести до поремећаја ћелијских функција или оштећења ДНК, што доводи до настајања мутација и потенцијално процеса канцерогенезе. Низ ензима и антиоксиданата је укључен у контролу и регулацију унутарћелијских концентрација липидних пероксида и продуката њихове разградње. На пример, високи нивои *GSH* могу инхибирати липидну пероксидацију и „ухватити“ липидне пероксиде чију разградњу катализује ензим *GSH-Px*.

Оксидативна модификација нуклеинских киселина подразумева реакцију РБК и РВА са различитим компонентама РНК и ДНК, што може довести до оштећења различитог степена. Оштећење пуринске базе гуанозина и стварање 8 хидрокси-д-гуанозина (енг. *8-hydroxydeoxyguanosine* - *8OHdG*) доводе до замене базног пара гуанин-цитозин са тимин-аденином. Даље долази до грешака у репликацији и геномске нестабилности, што води процесу мутагенезе, канцерогенезе и старења које представља биомаркер оксидативног стреса.

Оксидативна модификација протеина манифестује се променама њихове примарне, секундарне и терциралне структуре. Такође,  $\text{ONOO}^-$  и сродне РВА учествују у реакцијама нитровања аминокиселина и протеина (86). Протеини имају специфичну биолошку функцију, па њихова измена последично има јединствене функционалне последице.

### 3.4. Активација гена као одговор на оксидативни стрес

У циљу ублажавања или отклањања последица оксидативног стреса, ћелије покушавају да поново успоставе редокс равнотежу стимулацијом или супресијом гена који кодирају одбрамбене ензиме, структурне протеине и факторе транскрипције.

Нуклеарни фактор 2 (енг. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, *NRF2*) је важан транскрипцијски фактор који доприноси антиоксидативној заштити. Када се детектују РБК и РВА, *NRF2* се транслоцира из цитоплазме у једро и везује се за елемент антиоксидативног одговора (енг. *antioxidant response element*, *ARE*), који регулише експресију антиоксидативних и антиинфламаторних гена. Са годинама, ниво *NRF2* опада и слаби одбрана од оксидативног стреса што се може довести у везу са поремећајем ћелијске редокс хомеостазе, почетком неуродегенеративних процеса и различитих патолошких стања повезаних са процесом старења (87).

### 3.4. Улога оксидативног стреса у патогенези Алцхајмерове болести

Бројне студије су потврдиле улогу оксидативног стреса у етиологији и патогенези АБ (88 - 90). Биохемијски састав неурона чини их веома осетљивим на оксидативна оштећења. Мозак је најпогоднији за стварање и истовремено најосетљивији на дејство слободних

радикала пре свега јер има најинтензивније потребе за енергијом и најинтензивније процесе оксидативне фосфорилације. Такође, садржи велику количину полинезасићених масних киселина које граде мијелин и лако подлежу процесима хидроксилације због чега су посебно осетљиве на дејство слободних радикала. Са друге стране, слаба антиоксидативна заштита чини мозак погодним за стварање и осетљивим на дејство слободних радикала (91). Ипак, нису сви неурони једнако осетљиви на оксидативни стрес (92), па тако популације неурона које су осетљивије прве испољавају функционалну промену и смрт у процесу настанка неуродегенеративних болести, попут АБ. За разлику од неурона, ћелије глије, а посебно астроцити су отпорније на оксидативни стрес и при контролисаној активности испољавају неуропротективну улогу путем контроле метаболизма и транспорта глукозе, синтезе глутатиона и експресије антиоксидативних ензима. Са друге стране, неконтролисана, прекомерна активност их чини извором РВК и РВА.

Треба нагласити да је оксидативни стрес неселективна последица разних оштећења присутних и код других неуродегенеративних болести. Поређењем само параметара оксидативног стреса и антиоксидативне заштите код нпр. Паркинсонове болести и АБ, не бисмо могли да кажемо о којој патологији се ради. Ипак, оксидативни стрес је неизоставан део патогенезе АБ и преплиће се са другим променама карактеристичним за патологију АБ.

Оксидативни стрес се доводи у везу са главним хистопатолошким карактеристикама АБ, као што су депозити  $A\beta$  и тау протеина. Ипак, постоји много контрадикторних података и дилема међу научницима о тачној узрочно-последичној вези између  $A\beta$  и РВК. Појава маркера оксидативног стреса, која претходи акумулацији видљивих наслага амилоида (93, 94), сугерише да оксидативни стрес може бити једна од најранијих карактеристика АБ (58). *Mondragon-Rodriguez* и сарадници предложили су модел везе између оксидативног стреса и таложења  $A\beta$  у коме солубилни олигомери  $A\beta$  активирају волтажну зависне  $Ca^{2+}$  канале кроз које  $Ca^{2+}$  улази у неуроне (пре фибрилације  $A\beta$ ) и активира митохондрије и метаболичке ензиме за производњу РВК (95). Накупине  $A\beta$  и оксидативно оштећење су сигнали за покретање инфламацијског одговора у који се укључују микроглија и астроцити што све заједно доприноси сложености патологије АБ. Из овог разлога, стратегије које подстичу смањење оксидативног стреса могу бити потенцијално важне у третману АБ.

## I 4. ТРАНСКРАНИЈАЛНА МАГНЕТНА СТИМУЛАЦИЈА У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОЈ МЕДИЦИНИ

### 4.1. Историја неинвазивне моздане стимулације

Прве експерименте са магнетном стимулацијом спровео је *d'Arsonval* 1896. године стављајући главу испитаника у индукциони калем што је довело до настанка вртоглавице и синкопе. Касније су многи научници указали на феномен магнетофосфена, односно визуелних сензација изазваних стимулацијом мрежњаче услед промене магнетног поља. Магнетна стимулација неурона је спроведена тек неколико деценија касније, прво 1959. код жабе (96), а затим 1965. године код људи на периферним нервима (97). Најпре је коришћено осцилаторно магнетно поље у трајању од 40 милисекунди (*ms*). Први прототип магнетног стимулатора за стимулацију периферних нерава описан је 1982. године (98), користећи

импульсе у трајању од 2 ms када су регистровани моторни евоцирани потенцијали добијени магнетном стимулацијом *nervus medianus*-a.

Прва јавна демонстрација транскранијалне магнетне стимулације (енг. *transcranial magnetic stimulation*, ТМС) извршена је на IX конгресу клиничке неурофизиологије 1985. године (99). Транскранијална магнетна стимулација се показала корисном за испитивање моторних путева и брзине проводљивости, што је од значаја за неинвазивну дијагностику неуролошких поремећаја.

Првобитне ТМС студије су базиране на принципу подражај-одговор, а касније су узети у обзир накнадни ефекти произашли из примене инвазивне стимулације ЦНС-а на анималним моделима (100), чиме су проширене границе испитивања. Потом је уочено да понављањем појединачних магнетних пулсева на истом месту, настају промене кортикалне надражљивости чије трајање превазилази саму дужину стимулације, из чега је настала репетитивна ТМС (рТМС) коју је први пут произвела *Cadwell Laboratories* 1988. године и данас је једно од најперспективнијих области ТМС истраживања.

#### 4.2. Примена ТМС

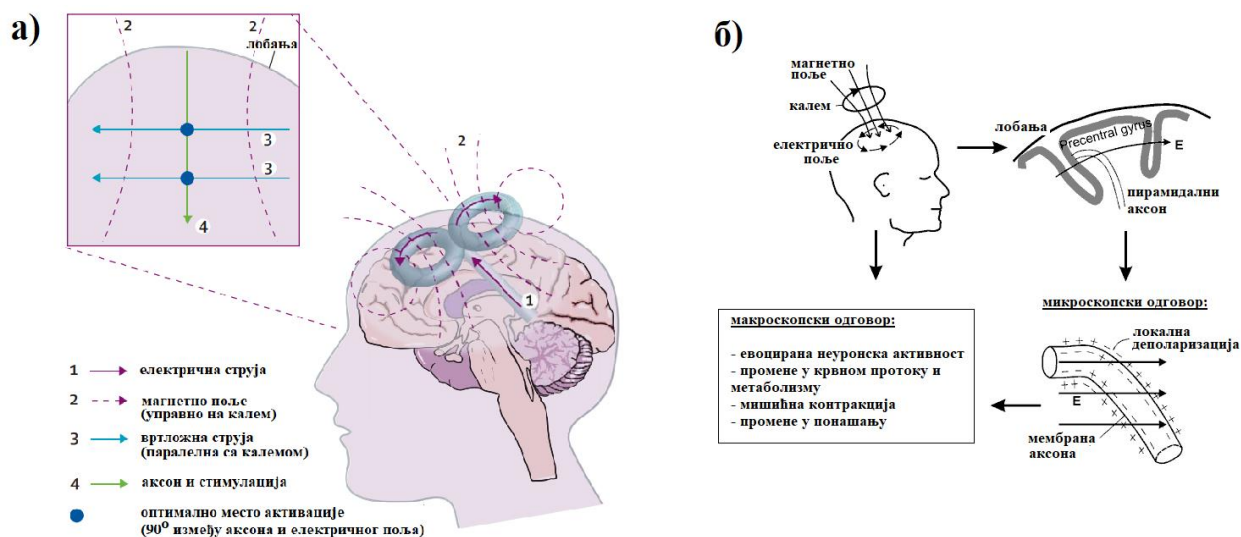
Магнетно поље код ТМС пролази кроз телесне структуре и не активира ноцицептивне рецепторе у кожи главе за разлику од транскранијалне електричне стимулације због чега је примена ТМС безболан метод стимулације. Примена ТМС користи се у сврху лечења код пацијената у будном стању на безболан начин уз висок степен ефикасности и безбедности (101). Имајући у виду да је ТМС прихватљива за испитанике и пацијенте, покренут је велики број истраживања, као и развој протокола за клиничку примену (102). Употребљава се за изучавање различитих функција мозга као што су моторне функције, учење, говор, вид, али и за испитивање механизма укључених у поремећаје можданих функција. Такође се примењује на здравој популацији у циљу побољшања когнитивних и моторних функција (103). Осим у циљу истраживања, користи се и у дијагностици и терапији неуролошких и психијатријских поремећаја. Управа за храну и лекове (енг. *The United States Food and Drug Administration; FDA*) је одобрила примену ТМС за третман одређених врста депресије и опсесивно-компулсивних поремећаја.

#### 4.3. Основни принципи ТМС

Транскранијална магнетна стимулација је неинвазивни облик стимулације мозга у коме се променљиво магнетно поље користи да изазове електричну струју у одређеном делу мозга. Метода се базира на Фарадејевом принципу електромагнетне индукције. Стимулациони калем се састоји од намотаја бакарне жице кроз који се пропушта снажна наизменична струја генерисана у стимулатору. Проласком струје кроз калем индукује се магнетно поље које за кратко време (око 100  $\mu$ s) достиже висок интензитет (1,5 – 2,5 Т) и скоро без отпора пролази лобању (103). Интензитет струје унутар калема је најјачи на ободима калема и опада ка центру. Линије флукса магнетног поља се пружају кроз хомогени медијум (мозак) вертикално у односу на раван калема и на дубини од 1,5-2 cm индукују

слабо електрично поље које је паралелно са равни калема, а смер кретања струје супротан је смеру у калему (104, 105).

На дистрибуцију електричног поља утиче положај неурона. Уколико се електрично поље простира у равни паралелној у односу на неуралне елементе, поље ће бити најнефективније у тачки у којој су промене интензитета највеће, али тако да са порастом растојања опада ефикасност. Уколико електрично поље није у целини паралелно, активација ће се дешавати на местима „савијања“ аксона због чега је важан облик коре који одређује оријентацију дугих аксона у односу на индуковано електрично поље. Локације стимулације су места дуж неурона на којима кроз неурилему пролази струја довољног интензитета да би се изазвала деполаризација (105) (Слика I 3). Уобичајена претпоставка је да је градијент електричног поља дуж аксона најважнији за стимулисање неурона, будући да висок градијент подразумева велики проток (електричног) набоја кроз зидове аксона, што изазива промену мембранског потенцијала (106).



Слика I 3. а) Неуронска активација помоћу ТМС, адаптирано према Edwards *et al.*, 2008 (107). Електрична струја у калему и струја индукована у мозгу од стране магнетног поља налазе се у истој равни (тангенцијално на површину лобање). Тамно плаве тачке на слици показују оптимално место активације неурона (тј. угао од 90° између аксона и електричног поља у мозгу).

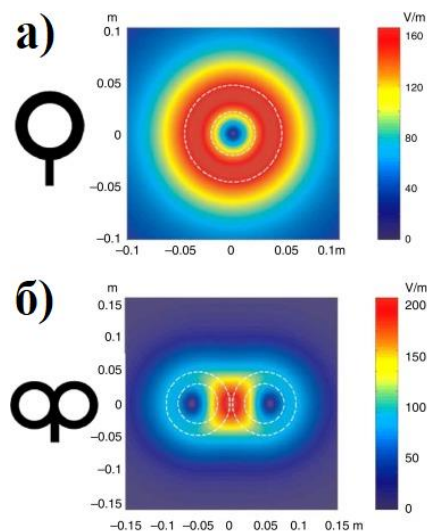
б) Принципи ТМС. Струја у калему генерише магнетно поље које индукује електрично поље у мозгу. Цртеж у горњем десном углу схематски илуструје бочни поглед на прецентрални гирус у десној хемисфери. Приказана су два пирамидна аксона. Електрично поље (E) утиче на трансмембрански потенцијал, што може довести до локалне деполаризације мембране и активирања неурона. Пирамидни аксони су вероватно стимулирани у близини кривина. На микроскопском нивоу електрична струја утиче на трансмембрански напон неурона, односно на волтажно зависне јонске канале. Макроскопски ефекат стимулације се може детектовати као евоцирана неуронска активност, промене у крвном протоку, метаболизму, као мишићна контракција или као промене понашања.



Нижи интензитет стимулације доводи до активације интернеурона možдане коре, док се код виших интензитета активирају кортикоспинални аксони. Транссинаптичким провођењем, ТМС индиректно делује и на структуре удаљене од места стимулације (104, 105). Такође је доказано да се трајне промене могу јавити у кори чак и када су неурони стимулирани на подпражним нивоима (108), што указује на дискретне ефекте неуронске стимулације индукцијом суптилних промена на молекулском нивоу.

Ефекат стимулације зависи и од временског размака између пулсева. Два пулса са сличним интензитетом електричног поља, али у различитим временским интервалима могу имати различите ефекте. Тако је показано да већи размак између пулсева смањује моторни праг и има сличне ефекте као повишени интензитет електричног поља (109).

Важни параметри који утичу на дистрибуцију електричног поља су величина, облик и оријентација калема. У првим истраживањима коришћени су кружни калемови, док су данас уређаји опремљени калемом у облику осмице (110). Калем облика круга, производи максималну јачину електричног поља директно испод спирално намотане жице, а са удаљавањем од ње јачина опада, због чега је слабо локализована стимулација možданог ткива. Са друге стране, калем облика осмице је конструисан са циљем да се створи усмереније електрично поље веће пенетрабилности (103). Јачина индуковане електричне струје је максимална директно испод центра калема где се укрштају две петље осмице, док се струја знатно слабијег интензитета индукује у ткиву испод обе спирале жице, чиме се постиже добра локализованост зоне стимулације (Слика 14.).



Слика 14. Расподела електричних поља код различитих облика калема, преузето из León Ruiz и сар., 2018 (111). а) Кружни облик калем; б) Калем облика осмице

Употребом конвенционалних ТМС калемова, индуковано електрично поље је практично ограничено на површинске слојеве možдане коре услед брзог опадања његовог интензитета са квадратом удаљености. Потреба за стимулацијом дубљих možданих структура, тј. за повећањем пенетрабилности стимулације је резултовала конструисањем калемова сложених геометријских облика (103, 112 – 114) У последњих двадесет година дизајнирано је много калемова који су користили различите геометријске распореде, али

ниједан калем није показао значајно побољшање прецизности области која се стимулише у односу на калем у облику броја осам (одобрен од стране *FDA* за лечење депресије), а да је при томе одржао јачину поља потребну за стимулацију одређене дубине мозга (115, 116).

#### 4.4. Интермитентни облик стимулације тета прасковима

Метода којом се низови магнетних пулсева примењују на специфичан део коре се назива репетитивна ТМС (рТМС). Распон фреквенције пулсева код примене рТМС је од 0,2 до 50 *Hz*. Протоколи у којима се користе нискофреквентни низови стимулуса ( $\leq 1$  *Hz*) се називају нискофреквентна или спора рТМС, а протоколи са фреквенцом већом од 5 *Hz* називају се високофреквентна или брза рТМС. Подела на брзу и спору рТМС је извршена на основу ефеката које изазивају приликом активације неуралних елемената (102, 103). Примећено је да примена нискофреквентне рТМС узрокује смањење (117), док високофреквентна рТМС узрокује пораст (112) надржаљивости мождане коре.

У оквиру рТМС, развијени су нови протоколи стимулације у којима се користе серије високофреквентних магнетних пулсева (50 *Hz*) груписаних по неколико заједно (четири уобичајено), који се понављају фреквенцијом од 5 *Hz*, односно у тета ритму. Због тога је овакав протокол и добио назив рТМС у тета ритму (енг. *Theta Burst Stimulation, TBS*) (102, 118). Протоколи *TBS* се користе да опонашају природне обрасце можданих импулса како би се повећала или смањила ексцитабилност специфичних подручја на површини мождане коре са релативно високом прецизношћу. Предност *TBS* протокола је релативно кратко време трајања (40–190 s), за разлику од неких рТМС протокола који могу да трају и до 30 минута.

Постоје два основна и најчешће употребљавана обрасца *TBS*, који се називају интермитентни (енг. *intermittent theta burst stimulation, iTBS*) и континуирани образац (енг. *Continuous Theta Burst Stimulation, cTBS*). На основу досадашњих сазнања опште је прихваћено да *iTBS* подстиче ексцитаторну неуротрансмисију, а да *cTBS* изазива њену супресију (103, 119). Интермитентни обрасци *TBS*-а (*iTBS*) имају тенденцију да повећају неуралну ексцитабилност и изазову дуготрајну потенцијацију (енг. *long term potentiation; LTP*) у циљаним неуронским круговима (120, 121).

Последњих година *iTBS* се све више користи као опција за опоравак неуролошких функција због кратког времена примене, једноставног оперативног протокола, ефекта који превазилази време стимулације и клиничке прихватљивости (122).

#### 4.5. Пацови као модели за проучавање ТМС

Пацови су први пут коришћени за проучавање ТМС 1990. године, након чега је дошло до напретка у ТМС студијама на животињама. Иако се глодари (мишеви, пацови) сматрају анималним моделима са највећим потенцијалом испитивања мождане функције, односно понашања, они нису једини избор за истраживање ТМС (101).

Поред бројних познатих предности које пацови имају као модел у експерименталној медицини, важно је што боље сагледати и слабости. Великим недостатком глодара као анималног модела, сматра се неадекватан однос величине главе према величини

стимулационог калема (123). Површина људског мозга омогућава тренутно доступним калемовима да прецизније стимулишу специфичне регионе мозга. Међутим, мали калемови који су тренутно доступни, стимулишу цео мозак глодара (124). Промена величине калема повлачи промену других параметара који доводе у питање значај и могућност примене добијених података на људе. (101). Такође, постоји изазов у интерпретацији резултата, имајући у виду да се површине коре миша и човека геометријски разликују, па самим тим се разликује и индукција поља на поменутим површинама (125).

Имобилизација, звук магнетног стимулатора и ефекти ТМС на мишиће резултирају стресним искуством за пацове. Ванћелијски нивои допамина у пречеаној можданој кори пацова су значајно повећани због стреса (126, 127) и потичу од процеса руковања животињом и изложености спољној средини (101). Због тога је важно имати и контролну групу животиња која ће проћи кроз исте аудитивне, тактилне и друге осећаје, само без примене стимулације.

#### 4.6. Молекулски механизам терапијских ефеката ТМС

Бројне експерименталне студије на животињским моделима, као и клиничка примена ТМС протокола показали су позитивне терапијске ефекте на неуродегенеративне поремећаје, укључујући и АБ (128, 129). Ипак, прецизан молекулски механизам ТМС на неуроресторативне ефекте код људи, односно животиња, још није у потпуности схваћен. Такође, нису прецизно познате неуролошке, инфламацијске, неуродегенеративне, апоптотичке, неуропротективне и генске промене током и после ТМС третмана код пацијената са АБ.

##### 4.6.1. Неуропротективни ефекат ТМС и инхибиција апоптотичне ћелијске смрти

У неуродегенеративним стањима, укључујући АБ, долази до повећања смрти неурона. Верује се да апоптоза делује као главни пут ћелијске смрти неурона (130, 131). Бројне студије на анималним моделима показале су да ТМС штити неуроне и инхибира програмирану ћелијску смрт. Инхибицијом неколико чланова породице Б-ћелијског лимфома 2 (енг. *B-cell lymphoma 2, Bcl-2*), посебно оних који стимулишу апоптозу, односно *Bad, Bax* и *Bcl-xS* (131, 132). Продужено излагање *rTMS* протоколу значајно повећава нивое рибонуклеинске киселине (РНК) за неуротрофични фактор можданог порекла (енг. *brain derived neurotrophic factor; BDNF*) након исхемије, што може допринети синаптичкој пластичности (133, 134). Стога многа истраживања сугеришу да ТМС испољава протективне ефекте блокирањем апоптозе, углавном путем регулисања експресије *BDNF, Bcl-2* и *Bax* (101, 135).

Примена *rTMS* протокола покреће неуроресторативне ефекте регулацијом експресије неуротрофних фактора који утичу на диференцијацију и преживљавање неурона (136). Бројне студије су указале на повећање *BDNF* у одређеним регионима мозга након примене ТМС (137, 138). Овај неуротрофин је укључен у промене синаптичке пластичности, побољшање процеса учења, памћења и когнитивних функција преко сигналног пута *BDNF*-тропомозион рецептор киназе Б (енг. *tropomyosin receptor kinase B, TrkB*) (128, 138).

Сигнални путеви у које је укључен *BDNF* имају кључну улогу у формирању синапси и памћења. Код АБ се уочава оштећење *BDNF*- посредоване сигнализације (139), као и смањена експресија *BDNF* (140). Поред неурона, и астроцити такође продукују и ослобађају *BDNF* и вероватно учествују у рТМС-посредованом смањењу меморијског оштећења. Сигнализација *BDNF-TrkB* и интеракција *TrkB* са *N*-метил-*D*-аспартатним рецепторима (*NMDAR*), регулисана рТМС-ом, повећава кортикалну екситабилност (141, 142). За разлику од примене рТМС протокола на АБ моделима, третман на здравим људима (143) и здравим животињама смањује експресију *BDNF* у одређеним можданим структурама (103).

#### 4.6.2. Утицај ТМС на оксидативни стрес

Бројне студије су показале утицај различитих облика ТМС на редокс статус. Способност ТМС да смањи оксидативна оштећења уочена је подизањем антиоксидативног капацитета преко стимулације антиоксидативних, односно смањењем или инхибицијом прооксидативних параметара (144).

Ипак, у литератури постоји мали број података о ефектима ТМС на оксидативни стрес у АБ. Недавна студија *Velioğlu*-а и сарадника (145) показала је повећање експресије *BDNF* и укупног антиоксидативног капацитета након рТМС-а (20 Hz). Оксидативни стрес може бити ефикасна мета за лечење неуродегенеративних поремећаја, међутим, не постоји довољно података о утицају ТМС-а на антиоксидативне одбрамбене системе, укупни оксидативни/антиоксидативни статус и антиоксидативне ензиме у анималним моделима АБ (144).

#### 4.6.3. Утицај ТМС на ћелије глије

Глија ћелије су много бројније од неурона и имају важну улогу у одржавању хомеостазе можданог ткива. Дисфункција ЦНС-а обухвата оштећења неурона и дисфункцију неуроглије (146) због чега су многа истраживања усмерена на утицај ТМС на глија ћелије (147) које имају важну улогу у опоравку мозга посредованом ТМС (101, 148).

##### 4.6.3.1. Ефекти ТМС на астроците

Астроцити могу директно или индиректно да реагују на електричну активност, што указује да би могли да посредују у неким од ефеката ТМС (147). Показано је да ТМС повећава астроцитозу и густину ћелија и може ограничити неуроинфламацију (149) која је присутна у АБ (150). Даље, физиолошка улога астроцита је, да под утицајем неуронске активности, ослобађају факторе који утичу на број синапси. Податак да рТМС мења број неуронских синапси у ЦНС-у (151) сугерише астроците као ћелијске ефекторе ТМС.

Уклањањем калијума, глутамата и *GABA* из синаптичке пукотине, које неурони ослобађају током неуротрансмисије, астроцити одржавају синаптичку функцију. Показано је да преузимање глутамата у астроците зависи од количине *VGLUT1* транспортера на чију експресију у фронталној, моторној, соматосензорној и визуелној кори пацова утиче рТМС

(152). Стога, као одговор на ТМС, вероватно је да астроцити детектују повећану активност неурона и да у складу са овим модулишу експресију *VGLUT1* како би осигурали адекватно уклањање глутамата из синапсе.

У физиолошким условима *GFAP* је маркер фиброзових астроцита (153). Премда након повреде ЦНС експресија овог протеина може бити појачана, промена у експресији *GFAP* може бити варијабилна (154) што га чини несавршеним маркером астроглиозе. Упркос томе, *GFAP* је маркер безбедности примене и утицаја ТМС на астроглиозу (147).

#### 4.6.3.2. Ефекти ТМС на микроглијске ћелије

Микроглије су специјализована врста макрофага која уклања оштећене неуроне, штити повређене структуре мозга, посредује у имунолошком одговору ЦНС (155) и у модулацији синаптичке пластичности (147). Микроглија би могла представљати добар дијагностички маркер за неуродегенеративне поремећаје (156, 157). Примена рТМС протокола модулацијом глија ћелија доприноси неуропротекцији или неурорепарацији у различитим моделима неуролошких болести. Показано је да високофреквентна магнетна стимулација смањује реактивност астроцита и микроглије, као и ослобађање проинфламаторних цитокина код животиња након лезије (158), док на здравим моделима овакви ефекти углавном изостају (148). Тренд смањења реактивности микроглије и астроцита јавља се и након примене *iTBS* (148).

#### 4.7. Утицај ТМС на понашање

Досадашња истраживања указују на потенцијални значај ТМС у бихејвиоралној и когнитивној рехабилитацији. Такође, постоји одређени број клиничких испитивања која показују позитивне ефекте на когнитивни исход. Ипак, прецизан неуробиолошки механизам није јасан и мало пажње је усмерено на испитивање потенцијалног утицаја *iTBS*-а на патогенезу АБ (137). Претпоставља се да се механизам дејства заснива на модулацији неуропластичности (120), односно да се кроз повећање експресије *BDNF* утиче на дуготрајну потенцијацију која се налази у основи памћења (138). Такође, постоје истраживања која потврђују да се позитивни ефекти стимулације тета прасковима који имају улогу у модулацији дуготрајне пластичности повезане са когнитивним променама у АБ, остварују преко *NMDA* рецептора (118). Могуће је да сви до сада познати позитивни ефекти *iTBS*, укључујући утицај на ћелије глије и оксидативни стрес спречавају синаптичку дисфункцију која се налази у основи когнитивног оштећења код пацијената са АБ.

## II ХИПОТЕЗА

Полазећи од наведених података из литературе, а имајући у виду да су недовољно разјашњени механизми деловања интермитентног облика стимулације тета прасковима (*iTBS*) на понашање, ћелијске и молекулске промене на експерименталном моделу Алцхајмерове болести (АБ), постављена је следећа хипотеза:

Десетодневна примена интермитентног облика стимулације тета прасковима побољшава параметре понашања (учење и памћење) и супримира активацију глија ћелија и настанак оксидативног/ нитрозативног стреса у пречеоној možданој кори, стријатуму, хипокампусу и малом мозгу на пацовском моделу Алцхајмерове деменције изазване билатералном интрацеребровентрикуларном апликацијом стрептозотоцина (СТЗ).

### III ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

У циљу провере постављене хипотезе, дефинисани су следећи циљеви истраживања:

1. Изазвати експериментални модел Алцхајмерове болести (АБ) код пацова билатералном интрацеребровентрикуларном апликацијом стрептозоцина (СТЗ);
2. На моделу АБ код пацова, испитати промене понашања (учење и памћење)-меморијски учинак, радну и референтну меморију;
3. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене интермитентног облика стимулације тета прасковима (*iTBS*) на параметре понашања (учење и памћење) - меморијски учинак, радна меморија и референтна меморија;
4. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене *iTBS* на морфологију ћелија глије у пречеоној можданој кори и хипокампусу;
5. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене *iTBS* на прооксидативне/ прониотрогативне параметре (супероксидни анион радикал -  $O_2^{\bullet-}$ , азот оксид -  $NO_2 + NO_3$ ), параметре оксидативног оштећења ћелијских мембрана (малондиалдехид – *MDA*) и оксидативног оштећења ДНК (8-хидрокси-2'-деоксигуанозин - *8-OHdG*) у ткиву пречеоне мождане коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга;
6. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене *iTBS* на параметре антиоксидативне заштите: активност супероксид дизмутазе (*tSOD*) и каталазе (*CAT*), концентрације глутатиона (*GSH*) и сулфхидрила (*SH* групе) и фактора регулације експресије антиоксидативних - протеина нуклеарног фактора 2 (*NRF2*) у ткиву пречеоне мождане коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга;
7. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене *iTBS* на промене у концентрацији протеина одговора на рани фактор раста 1 (*EGR1*) и амилоидних протеина (амилоидни прекурсорски протеин - *APP*,  $\beta$  амилоид -  $A\beta_{1-42}$ ) у пречеоној можданој кори, стријатуму, хипокампусу и малом мозгу;
8. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене *iTBS* на експресију неуротрофичног фактора можданог порекла (*BDNF*) у ткиву пречеоне мождане коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга;
9. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене *iTBS* на експресију мембранског транспортера за ексцитаторне аминокиселине 2 (*EAAT2*) у ткиву пречеоне мождане коре и хипокампуса.

## IV МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

### IV 1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДИЗАЈН

#### 1.1. Експерименталне животиње

У истраживање су били укључени мужјаци пацова *Wistar* соја старости 10 недеља, просечне телесне масе око 300 грама. Животиње су одгојене и чуване у Центру ветеринарске службе, Управе за војно здравство Министарства одбране. Током рада са животињама поштовани су етички принципи рада на лабораторијским животињама Војномедицинске академије у Београду, као и Закон о заштити животиња („Службени гласник РС“, број 41/09), који су у складу са правилима Директиве европског парламента о заштити животиња коришћених за научне сврхе 2010/63/ЕУ од 22.09.2010. године. Експеримент је одобрен од стране Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде, Управе за ветерину (број 323-07-08358/2020-05).

Животиње су чуване у виваријуму, у полиетиленским кавезима (*Tecniplast S.p.A*, Шведска) са жичаном решетком на врху (по 3 животиње у кавезу), у климатски контролисаним условима (температура од  $23 \pm 2$  °C, релативна влажност ваздуха  $55 \pm 3\%$ , са циклусима светло/тама 12/12ч). Током трајања експеримента, све животиње су живе у истим условима, са слободним приступом храни (храна за пацове у пелетираном облику, „*Gebi*“, Чантавир, Суботица) и води из пластичних појилица (*Tecniplast S.p.A*, Шведска). Одступање од неограниченог приступа храни је направљено у току трајања тестирања у зракастом лавиринту (када је доступност хране ограничена на 80%).

#### 1.2. Експерименталне групе и протокол

Како би се обезбедила полазна основа за праћење когнитивног статуса, све животиње ( $n = 51$ ) су прво тестиране у зракастом лавиринту са осам кракова – *RAM I* (енг. *radial arm maze – RAM*), након чега су методом случајног узорка подељене у две основне групе: контролну, коју чине животиње које су ицв примиле физиолошки раствор и групу животиња које су ицв примиле СТЗ. Након 30 дана, животиње су тестиране на тесту ротирајућег цилиндра (*Rotarod*) за процену моторичких способности. Само животиње које су показале нормалну моторичку активност су даље тестиране у зракастом лавиринту са осам кракова – *RAM II*.



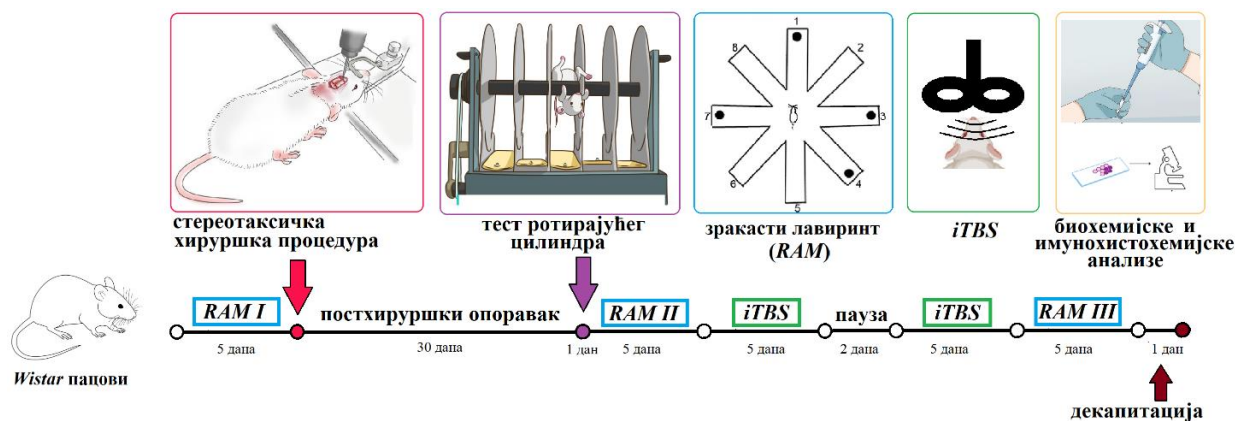


Схема IV 1. Схематски приказ плана експерименталног протокола и подела животиња у групе

Након теста, животиње из контролне групе су методом случајног узорка подељене у две експерименталне групе: контролна група (К) и контролна група која ће бити третирана *iTBS* протоколом (К+*iTBS*), док су животиње из СТЗ групе методом случајног узорка подељене у три експерименталне групе: стрептозототин група (СТЗ), стрептозототин група која ће бити третирана *iTBS* протоколом (СТЗ+*iTBS*) и стрептозототин група која ће бити изложена плацебо ефекту (СТЗ+плацебо), односно имати контакт са истраживачем и звучни стимулус апарата без стварне стимулације.

Након *iTBS* третмана, животиње из свих експерименталних група су поново тестиране у зракастом лавиринту – *RAM III*. По завршетку последњег теста извршена је декапитација животиња, након чега су на леду изоловани цели мозгови за имунохистохемијске анализе, односно мождане структуре (пречеона мождана кора, стријатум, хипокампус и мали мозак) за биохемијске анализе.

Табела IV 1. Табеларни приказ експерименталних група

|                        |                                      |   |
|------------------------|--------------------------------------|---|
| <b>К</b>               | контрола                             | ицв апликација физиолошког раствора                                       |
| <b>СТЗ</b>             | стрептозототин                       | ицв апликација СТЗ  |
| <b>СТЗ+<i>iTBS</i></b> | стрептозототин и <i>iTBS</i>         | ицв апликација СТЗ и <i>iTBS</i> протокол од 43-47. и од 50-54. дана      |
| <b>К+<i>iTBS</i></b>   | контрола и <i>iTBS</i>               | ицвапликација СТЗ и <i>iTBS</i> протокол од 43-47. и од 50-54. дана       |
| <b>СТЗ+плацебо</b>     | стрептозототин и <i>iTBS</i> плацебо | ицв апликација СТЗ и лажни третман <i>iTBS</i> од 43-47. и од 50-54. дана |

## IV 2. СТЕРЕОТАКСИЧКА ХИРУРШКА ПРОЦЕДУРА

Стереотаксичка хируршка процедура је поступак који се користи за прецизно усмеравање хируршких инструмената или уређаја на тачно одређене циљеве у мозгу. Животиње су подвргнуте овој процедури према Santos и сарадницима (70) са мањим изменама. На почетку, свака животиња је анестезирана интраперитонеалном инјекцијом (ип) *Ketamidor*-а (50 mg/kg телесне масе; *Richter Pharma AG*, Аустрија) и 2% *Xylased*-а (5 mg/kg телесне масе; *Bioveta*, Чешка Република). У циљу спречавања možданог едема, животиње су примиле ип *Dexaveto* (2,5 mg/kg телесне масе, *V.M.D.*, Белгија). Затим је свака животиња фиксирана на рам стереотаксичког инструмента за мале животиње (*La Precision Cinematographique*, Париз, Француска). Као полазна тачка коришћена је брегма (тачка где се сусрећу коронални и сагитални шав лобање), а уз помоћ стереотаксичког координатног атласа (159) подешене су координате за бочне коморе (антерио-постериорно = -0,8; медио-латерално = ±1,5; дорзо-вентрално = -3,8). Помоћу *Hamilton* микрошприца извршена је билатерална ицв апликација 3 mg/kg (160, 161) раствора СТЗ (*Tocris Bioscience*, УК) свеже раствореног у физиолошком раствору (0,9% NaCl; Хемофарм, Србија) (162), у запремини од 5  $\mu$ l у сваку комору са константном брзином протока од 0,4  $\mu$ l/мин. Контролна група је подвргнута истој хируршкој процедури, са разликом што је ицв апликован само физиолошки раствор. У циљу спречавања бола, инфекције и дехидрације, пацови су примали једнократно *Butorphanol* (50  $\mu$ g/kg телесне масе; *Richter Pharma*, Аустрија) и 3 ml 0,9% раствора натријум хлорида, а антибиотик *Enroxil* (10 mg/kg телесне масе; *Krka*, Словенија) 5 дана након операције (163).

## IV 3. ТЕСТОВИ ПОНАШАЊА

### 3.1. Тест ротирајућег цилиндра за процену моторичких способности

Тест ротирајућег цилиндра (Елунит, Србија) служи за процену моторичких способности експерименталних животиња (164). Апарат се састоји од хоризонтално ротирајућег ваљка који је постављен на висини на којој ће животиње избегавати пад, а са друге стране неће се повредити уколико до пада и дође. Испод ваљка је папучица са магнетом која региструје пад животиње, а сам уређај је повезан са *RotaSoft* софтвером путем кога се подешавају радни параметри (различити режими контроле брзине и смера ротације ваљка), бележе и чувају резултати теста. Тест је урађен 30 дана након операције на стереотакси да би се елиминисала сумња на оштећење моторичке функције које је могло настати као последица убодне повреде у току извођења интервенције. Пре почетка рада, глодар се поставља на ваљак и природно покушава да остане на ротирајућој површини и не падне на земљу. Свака животиња је постављена на ваљак и остављена да мирује 10 секунди при брзини од 0 обртаја у минуту, након чега почиње *Rotarod* тест. Укупно трајање појединачног теста је 5 минута при чему је за прва 2 минута подешено убрзање од 1 - 5 обртаја у минуту, а наредна 3 минута се убрзање повећава на 5 - 20 обртаја у минуту. Свака животиња је тестирана 3 пута дневно у временским размацима већим од 30 минута да би се избегао замор. Забележено је најдуже време до пада проведено на ваљку и укупно време проведено на ваљку у току теста, односно најбољи резултат у сва 3 покушаја. Животиње

које нису могле да стоје 10 секунди на ваљку у три узастопна покушаја, елиминисане су из експеримента и означене као моторно оштећене.

### 3.2. Тест у зракастом лавиринту са осам кракова

Тест у зракастом лавиринту је коришћен за анализу просторног учења и памћења (63; 165). Изведен је у осмокраком зракастом лавиринту (Елунит, Србија) од црног плексигласа на металној подлози, уздигнутој 50 cm изнад пода. Лавиринт се састоји од осмоугаоне централне арене (пречник 28 cm) и осам зракасто постављених кракова (дужина 70 cm, ширина 10 cm) нумерисаних у смеру казаљке на сату бројевима од 1 - 8. На крају сваког крака налази се посуда за мамац облика бунара (пречник 4 cm и дубина 2 cm,). Мамац у овом случају представља мањи комадић пелетиране хране за пацове. Пре теста, пацови су држани на ограниченом режиму исхране (смањено на 80% дневног уноса) који је одређен пре почетка експеримента (166) како би били мотивисани да траже храну, док је вода била доступна неограничено. У току трајања студије тест је обављен три пута на свим огледним животињама: на почетку експеримента (*RAM I*), 30 дана након операције (*RAM II*) и након завршеног *iTBS* третмана (*RAM III*). Пре *RAM I* теста, спроведен је дводневни период навикавања у трајању од 10 минута дневно. Први дан су пелети хране расути по целом лавиринту и свакој животињи појединачно је било дозвољено да слободно истражује лавиринт у ограниченом времену (10 минута). Другог дана навикавања, храна је углавном померена ка крајевима кракова и у посудама за мамац. Након фазе навикавања започео је цео експеримент, односно први тест у зракастом лавиринту - *RAM I*. Тест је трајао 5 дана, при чему се прва три дана сматрају периодом учења, а преостала два дана чине период тестирања. Животиње су трениране, односно тестиране дневно по 10 минута. Појединачно, свака животиња је постављена у централну арену лавиринта (увек са истом оријентацијом тела). Мамац, односно пелетирана храна је постављена увек у исте посуде (у крацима број 1, 3, 4 и 7) сваког дана тренинга и теста, док су посуде у крацима број 2, 5, 6 и 8 биле празне у току експеримента. Дневни тест се завршава када истекне 10 минута или када животиња поједе или помери храну из све четири посуде.

Када животиња са сва четири екстремитета пређе границу између централне арене и крака, то се рачунало као улазак у крак. Резултати тестирања који се узимају у обзир у току испитивања се дефинишу као број „тачних улазака“ (први улазак у крак где се налази мамац) и број „нетачних улазака“ (поновни улазак у крак у коме је животиња већ била или улазак у крак који не садржи мамац). На основу овога, израчунава се меморијски учинак - енг. *Memory Score* (167, 168):

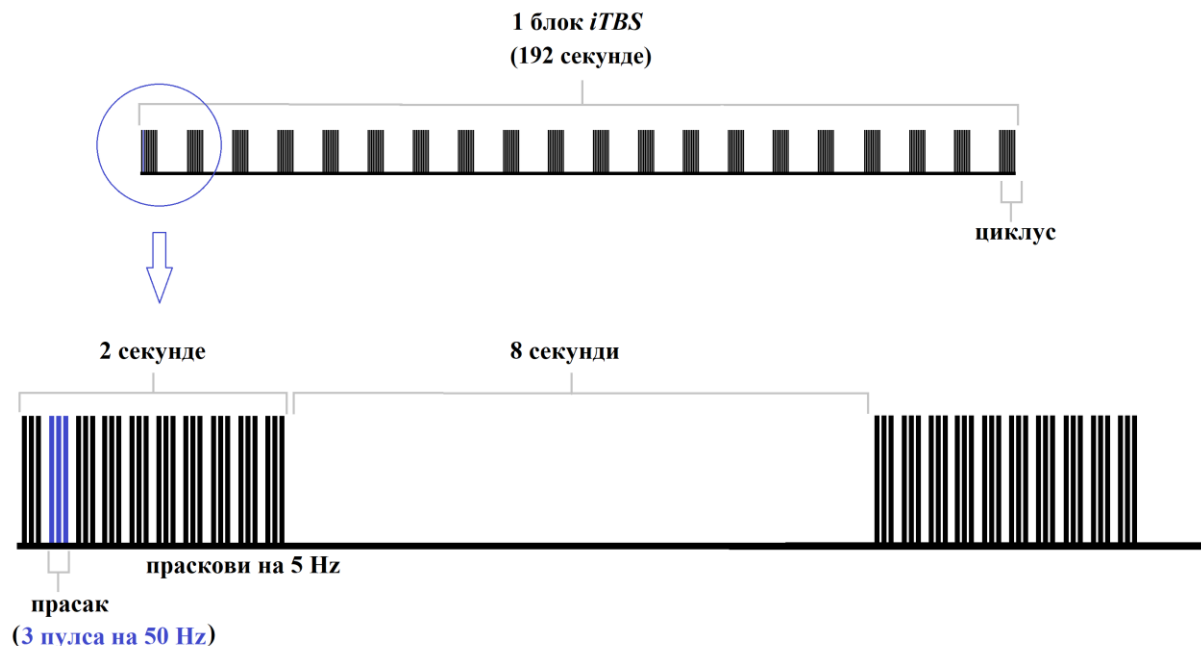
$$\text{меморијски учинак} = \frac{(\text{број тачних улазака} - \text{број нетачних улазака})}{(\text{број тачних улазака} + \text{број нетачних улазака})}$$

Резултат ове једначине представља скалу меморијског учинка са распоном од -1 до 1, где резултат 1 одражава савршен резултат када је животиња остварила само „тачне уласке“ (167). Поред овога, вредновано је и време за које се изврши задатак, односно време потребно да се сва 4 мамца помере. Уколико животиња не испуни цео задатак, бележи се

време од 10 минута. Прикупљени подаци су представљени још и као грешке референтне меморије (поновни улазак у краке који никада нису садржали мамце) и грешке радне меморије (поновни улазак у краке где је мамац већ померен). Референтна меморија представља дугорочну меморију за информације које остају константне током поновљених покушаја (памћење положаја кракова у којима се налази мамац), док се радна меморија сматра краткорочном меморијом у којој се информације које треба запамтити мењају у сваком покушају (памћење позиције кракова који су већ посећени у току дневног теста) (169). Како се тест заснива на сналажењу животиње у лавиринту уз помоћ сећања и просторне оријентације, на крају сваког испитивања, лавиринт је очишћен са 70% етанолом да би се елиминисали мирисни трагови, а распоред предмета у просторији остаје непромењен како би визуелни оријентирани остали константни током времена.

#### IV 4. *ITBS* ПРОТОКОЛ

Транскранијална магнетна стимулација је примењена у *iTBS* облику помоћу *MagStim Rapid<sup>2</sup>* апарата (*The MagStim Company, Whitland, Dyfed, UK*) и калема облика осмице дијаметра 25 mm по протоколу који је претходно дефинисан од стране *Huang* и сарадника (118). За време стимулације, калем се поставља непосредно изнад главе у пројекцији сагиталне линије, тако да је центар калема позициониран изнад брегме, а кретање животиње је ограничено од стране испитивача. Интезитет магнетне стимулације је примењиван при интезитету од 80% прага моторног надражаја (праг - надражај који изазива видљиву контракцију предњих екстремитета, бркова или усног апарата). Блок *iTBS* се састоји од 20 циклуса са по 10 тзв. праскова (сваки прасак садржи 3 пулса на фреквенцији од 50 Hz), који су се понављали на 5 Hz у трајању од 192 s са интервалима од 10 s између циклуса, тако да је сваки блок садржао укупно 600 импулса (Слика IV 1.). Третман *iTBS* протоколом примењиван је једном дневно, у облику две петодневне сесије са паузом од два дана између сесија. Плацебо група животиња (СТЗ+плацебо) је изложена звуку апарата по *iTBS* протоколу без стварне стимулације и идентичној манипулацији од стране истраживача у смислу краткотрајне делимичне имобилизације.



Слика IV 1. Схематски приказ iTBS протокола

#### IV 5. ХИСТОХЕМИЈА, ИМУНОХИСТОХЕМИЈА И ФЛУОРЕСЦЕНТНА МИКРОСКОПИЈА

За имунохистохемијску анализу су издвојене по три животиње из сваке експерименталне групе.

*Реагенси:*

- 4% параформалдехид (ПФА) у 0,1 М раствору фосфатног пуфера,  $pH=7,4$
- 10%, 20% и 30% сахароза растворена у 0,2 М раствору фосфатног пуфера

*Поступак:*

Декапитација је извршена уз помоћ мале гиљотине за животиње (*Harvard* апарат). Изолација мозга је вршена на леду, након чега је ткиво фиксирано у 4% ПФА (24 часа, 4 °C). Након тога, следила је дехидратација мозга у растућим концентрацијама сахарозе на 4 °C. Сечење је вршено на криотому (*Leica CM1850*) на температури од -23 °C. Пресеци дорзалног хипокампуса и пречеоне мождане коре дебљине 20  $\mu m$  су прикупљени серијски и постављени на предметна стакла, након чега су сушени 2 сата на собној температури и чувани на -20 °C до даље употребе.

## 5.1. Нислово (тионинско) бојење

Нислово бојење пресека ткива служи за општи преглед цитоархитектуре можданог ткива. Приликом тионинског бојења, тионин се као базна боја везује за киселе структуре (нуклеинске киселине, преферентно рибонуклеинске киселине; РНК) и уочава се Нислова супстанца односно грануларни ендоплазматични ретикулум.

### *Реагенси:*

- фосфатни пуфер
- 0,5% раствор тионина
- 70%, 95% и 100% етанол
- ксилен
- *DPX* медијум за фиксирање

### *Поступак:*

Прво су плочице са пресецима темперирани на собној температури 30 минута, затим су потопљене у фосфатни пуфер 5 минута. Потом је следила инкубација са тионином (20 минута), испирање у фосфатном пуферу (2 минута), дехидрација растућим концентрацијама етанола (70%, 95% и 100%, по 5 минута) и просветљавање ксиленом (2× 5 минута). Пресеци су фиксирани коришћењем *DPX* медијума (*Sigma Aldrich*, САД) и анализирани под светлосним микроскопом.

## 5.2. Имунохистохемија

Имунохистохемијска метода подразумева детекцију протеина од интереса, односно детекцију ћелија и ткива која садрже специфичне протеине. Ћелије микроглије су детектоване маркером јонизујући калцијум-везујућим адапторним молекулом (енг. *ionized calcium binding adaptor molecule 1; Iba1*).

### *Реагенси:*

- фосфатни пуфер
- 0,3%  $H_2O_2$  растворен у метанолу
- раствор за блокирање – 5% нормални магарећи серум
- примарно антитело *Iba1* (табела 4.2.)
- секундарно антитело спрегнуто са пероксидазом рена (енг. *Horse radish peroxidase - HRP*) (табела 4.2.)
- 3,3'-С-диаминобензидин-тетрахидрохлорид кит (*DAB, Abcam*, УК)
- 50%, 70%, 95% и 100% етанол
- ксилен
- *DPX* медијум за фиксирање (*Sigma Aldrich*, САД)

### *Поступак:*

Плочице са пресецима су 30 минута темперирани на собној температури, затим испране у фосфатном пуферу (2×5 минута). Како би се избегло неспецифично бојење, плочице су 20 минута инкубирани са H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у метанолу, а затим испране у фосфатном пуферу (3×5 минута). У циљу спречавања неспецифичног везивања антитела, извршена је инкубација 60 минута у раствору за блокирање, након чега је следила инкубација са раствором примарног антитела *Iba1* (преко ноћи, 4 °C) и испирање у фосфатном пуферу (3×5 минута). Инкубација са раствором секундарног антитела је извршена на собној температури у трајању од 2 сата. Сигнал је детектован коришћењем *DAB* кита као хромогена за секундарна антитела спрегнута са *HRP*. Дехидрација је извршена растућим концентрацијама етанола (по 5 минута), након чега је следило просветљавање ксиленом (2×5 минута) и фиксирање у *DPX* медијуму. Дигиталне слике (2088 x 1550 пиксела) су добијене помоћу светлосног микроскопа марке *LEITZ DM RB (Leica Mikroskopie & Systems GmbH, Немачка)*, камере марке *LEICA DFC320 CCD (Leica Microsystems, Швајцарска)* и *LEICA DFC* софтвера (*Leica, Немачка*).

### 5.3. Имунофлуоресцентно бојење

Имунофлуоресцентно бојење је коришћено за детекцију астроцита уз помоћ следећих маркера: 1. Глијални фибриларни кисели протеин (енг. *glial fibrillary acidic protein; GFAP*) и 2. Виментин (енг. *Vimentin; Vim*).

#### *Реагенси:*

- фосфатни пуфер
- раствор за блокирање – 5% нормални магарећи серум
- примарна антитела: *GFAP* и *Vim* (табела 4.2.)
- секундарна антитела (табела 4.2.)
- *Mowiol* за фиксирање (*Calbiochem, Немачка*)

#### *Поступак:*

Плочице са пресецима су 30 минута темперирани на собној температури, затим испране у фосфатном пуферу (3×5 минута) и 60 минута инкубирани раствором за блокирање. Након инкубације са примарним антителима преко ноћи на 4 °C, уследило је испирање 3 пута у фосфатном пуферу, а затим инкубација 2 сата са секундарним антителима која су обележена одговарајућом флуоресцентном бојом. Испирање плочица је вршено 3 пута у фосфатном пуферу у мраку, након чега су фиксиране и пресеци анализирани на конфокалном микроскопу.

Табела 4.2. Списак антитела

| Антитело   | Порекло и тип            | Разблажење            | Произвођач   |
|--|--------------------------|-----------------------|--|
| Јонизујући калцијум – везујући адапторни молекул<br>(енг. <i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i> )<br><b>Iba1</b> | козје,<br>ПОЛИКЛОНСКО    | 1:400 <sup>ИХХ</sup>  | <i>Abcam ab5076, RRID: AB_2224402</i>                    |
| Глијални фибриларни кисели протеин<br>(енг. <i>Glial fibrillary acidic protein</i> )<br><b>GFAP</b>                          | зечје,<br>ПОЛИКЛОНСКО    | 1:600 <sup>ИФ</sup>   | <i>DAKO, Agilent Z0334, RRID: AB_10013382</i>            |
| Виментин<br>(енг. <i>Vimentin</i> )<br><b>Vim</b>  | мишје,<br>МОНОКЛОНСКО    | 1:300 <sup>ИФ</sup>   | <i>DAKO M0725, RRID: AB_10013485</i>                     |
| Транспортер ексцитаторних аминокиселина 2<br>(енг. <i>Excitatory amino acid transporter 2</i> ) <b>EAAT2</b>                 | зечје,<br>МОНОКЛОНСКО    | 1:1000 <sup>WB</sup>  | <i>Abcam ab69098 RRID: AB_2190732</i>                    |
| β актин спрегнут са <i>HRP</i><br>(енг. <i>HRP Anti-beta Actin antibody</i> )<br><b>β actin</b>                              | мишје,<br>МОНОКЛОНСКО    | 1:5000 <sup>WB</sup>  | <i>Abcam ab49900, RRID: AB_867494</i>                    |
| Анти-мишје <i>HRP</i> -коњуговано антитело   | козје,<br>ПОЛИКЛОНСКО    | 1:200 <sup>ИХХ</sup>  | <i>R&amp;D Systems, HAF007, RRID: AB_357234</i>          |
| Анти-зечје антитело коњуговано са <i>Alexa Fluor 555</i>   | магареће,<br>ПОЛИКЛОНСКО | 1:400 <sup>ИФ</sup>   | <i>Invitrogen A-21206, RRID: AB_141708</i>               |
| Анти-мишје антитело коњуговано са <i>Alexa Fluor 647</i>   | магареће,<br>ПОЛИКЛОНСКО | 1:400 <sup>ИФ</sup>   | <i>Thermo Fisher Scientific, A31571, RRID: AB_162542</i> |
| Анти-козје антитело коњуговано са <i>Alexa Fluor 488</i>   | магареће,<br>ПОЛИКЛОНСКО | 1:400 <sup>ИФ</sup>   | <i>Invitrogen A-11055, RRID: AB_142672</i>               |
| Анти-зечје <i>HRP</i> -коњуговано антитело   | козје,<br>ПОЛИКЛОНСКО    | 1:30000 <sup>WB</sup> | <i>Abcam ab6721, RRID: AB_955447</i>                     |

*Iba1* = Јонизујући калцијум-везујући адапторни молекул (енг. *Ionized calcium-binding adaptor molecule 1*); *GFAP* = Глијски фибриларни кисели протеин (енг. *Glial Fibrillary Acidic Protein*); *C3* = Компонента комплемента 3 (енг. *Complement factor 3*); *EAAT2* = Транспортер ексцитаторних аминокиселина 2 (енг. *Excitatory Amino Acid Transporter 2*); *HRP* =



пероксидаза рена (енг. *Horseradish peroxidase*); ИХХ = имунохистохемија; ИФ = имунофлуоресценца; *WB* = *Western blot*;

#### IV 6. ПРИПРЕМА ХОМОГЕНАТА ТКИВА И ОДРЕЂИВАЊЕ УКУПНЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ПРОТЕИНА

Након декапитације, мозгови су пажљиво уклоњени из лобање. Одабране мождане структуре (пречеона мождана кора, стријатум, хипокампус и мали мозак) су изоловане на леду и у криотубама пребачене у течни азот за тренутно замрзавање, затим чуване на  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  до даље анализе. Замрзнути региони мозга су хомогенизовани у пуферу (0,32 М сахароза и 5 mM Tris,  $\text{pH}=7,4$ ) и центрифугирани 10 минута на 3000 обртаја у минути, на  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Супернатант је пажљиво издвојен, а концентрација протеина је одређена *Lowry* методом модификованом по *Markwell*-у и сарадницима (170).

*Реагенси:*

- *ROR* (2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  анхидровани; 0,16%  $\text{NaK}$ -тартарат  $\times 4\text{ H}_2\text{O}$ ; 1% SDS;  $\text{H}_2\text{O}$ )
- *Реагенс А* (100  $\mu\text{l}$  ROR : 1  $\mu\text{l}$   $\text{CuSO}_4$ )
- *Реагенс Б* (фолин :  $\text{H}_2\text{O}$  = 1 : 1)
- 1N (М)  $\text{NaOH}$

*Поступак:*

10  $\mu\text{l}$  узорка је инкубирано у 890  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  са 100  $\mu\text{l}$  1N (М)  $\text{NaOH}$  у трајању од 10 минута на собној температури. Након додавања 3 ml реагенса А, узорак је инкубиран 20 минута, а додавањем 300  $\mu\text{l}$  реагенса Б додатно је инкубиран 45 минута на собној температури. Мерење концентрације протеина вршено је на спектрофотометру при таласној дужини од 750 nm (*SynergyHT*, *BioTek*, САД), а вредности су изражене у  $\text{mg/ml}$  протеина на основу познатих вредности из стандардне криве.

#### IV 7. WESTERN BLOT АНАЛИЗА

Детекција протеина имуноблот (енг. *Western blot*) лабораторијском методом заснива се на раздвајању протеина на основу молекулске масе (електрофореза) и специфичној интеракцији антиген - антитело (имуноблот). Ова метода је коришћена за детекцију транспортера ексцитаторних аминокиселина 2 (енг. *Excitatory Amino Acid Transporter 2*; *EAAT2*) (табела 4.2.)

*Реагенси:*

- *Laemmli* пуфер (20% глицерол, 0,02% бромфенол плаво, 125 mmol/l Tris HCl и 4% натријум додецил сулфат (енгл. *Sodium Dodecyl Sulfate*; *SDS*))

- 10% полиакриламидни гел
- Маркер – скуп протеина познатих молекулских маса (*Thermo Scientific Prestained Protein Molecular Weight Marker*, САД)
- Пуфер за електрофорезу (енг. *Running buffer*)
- Пуфер за пренос протеина са гела на мембрану (енг. *Transfer buffer*)
- *TBST* (енг. *Tris Buffer Saline*; 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)
- 5% немасно млеко у праху (растворено у *TBST*)
- примарна антитела (растворена у *TBST*): *EAAT2*,  $\beta$  – актин (табела 4.2.)
- секундарно антитело
- луминол и водоник пероксид *Clarity ECL* супстрат (*Bio-Rad, Hercules*, САД)
- пуфер за благо стриповање (енг. *Mild stripping buffer*): 0,2 mmol/l глицин, 0,1% *SDS*, и 1% *Tween-20*; pH=2,2

#### Поступак:

Узорци сведени на концентрацију протеина од 10  $\mu$ g су растворени у *Laemmli* пуферу (6x концентрованом) и инкубирани 5 минута на 95 °C чиме је извршена денатурација протеина. Овако припремљени узорци (10  $\mu$ l) и маркер (2  $\mu$ l) су наливени у бунаре на 10% геловима. На основу своје молекулске масе, протеини се у електричном пољу (100 - 120 mA, 90 минута) разврставају на одговарајућим нивоима гела, спрам своје величине (пуфер за електрофорезу). Након тога се преносе на *PVDF* (енг. *Polyvinylidene difluoride*) мембране (0.45 mm, *Millipore*, Немачка) на 350V у трајању од 75 минута у систему влажне коморе за пренос (пуфер за пренос протеина). Даље, у циљу блокирања неспецифичног везивања антитела, мембране су инкубирани 60 минута на собној температури у 5% немасном млеку. Преко ноћи, на температури од 4 °C, мембране су инкубирани са раствором примарног антитела. Након тога су испране 3x по 5 минута у *TBST* -у и инкубирани одговарајућим раствором секундарног антитела 2 сата на собној температури, и поново испране 3x по 5 минута у *TBST*-у. Траке су визуелизоване са *Clarity ECL* субстратом и *Chemi Doc-It imaging* системом (*Ultra-Violet Products Ltd.*, Кембриџ, УК). Квантификација детектоване флуоресценце је извршена семиквантитативном методом коришћењем *ImageJ* софтвера. Стриповањем мембрана су уклоњена антитела (пуфер за благо стриповање) и мембране су даље инкубирани са референтним протеином ( $\beta$  – актин). Вредности оптичких густина трака протеина *EAAT2* су нормализоване у односу на одговарајуће вредности оптичких густина трака интерне контроле ( $\beta$  – актин), а затим су резултати изражени као проценат средње вредности контроле.

## IV 8. ОДРЕЂИВАЊЕ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАТИВНОГ И НИТРОЗАТИВНОГ СТРЕСА И АНТИОКСИДАТИВНЕ ЗАШТИТЕ

### 8.1. Одређивање супероксидног анион радикала

Као мера стварања супероксидног анион радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ) у биолошким системима користи се редукција нитроблу тетразолијума (*NBT*) до нитроблу-формаза (*NBT*) (171). Оксидовани

облик *NBT* је жуте боје и растворљив у води у поређењу са редукованим обликом који је плаве боје и мање растворљив. Редукција *NBT* се одвија у два корака:

- непотпуна редукција до моноформаза:  $NBT + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + \text{моноформазан}$
- комплетна редукција *NBT*-хлорида до диформаза:  $NBT^{++} + 2Cl^- + 4e^- + 4H^+ \rightarrow \text{диформазан} + 2HCl$

*Реагенси:*

- *Реакциона смеша* (1 mM *NBT* раствореног у 0,05 M фосфатном пуферу са 0,1 mM етилендиаминотетрасирћетном киселином (*EDTA*),  $pH=8.6$  и 0,1 mg/ml желатина) – служи да одржава *NBT* - формазан у раствору.

*Поступак:*

Поступак подразумева излагање реакционе смеше дејству азота под притиском (1 сат) чиме се постиже смањење напона кисеоника у медијуму. У 1 ml реакционе смеше је пипетирано 0,05 ml узорка и у току 5 минута је праћена промена екстинкције на таласној дужини од 550 nm. Стварање  $O_2^{\bullet-}$  се изражава као  $\mu\text{mol}$  редукованог *NBT*/мин/mg протеина.

## 8.2. Одређивање садржаја нитрита и нитрата ( $NO_2 + NO_3$ ) у хомогенатима ткива

Нитрити и нитрати ( $NO_2 + NO_3$ ) у организму настају оксидацијом ендогено створеног азот монооксида, па се процена степена нитрозативног стреса, одређује на основу концентрација  $NO_2 + NO_3$  у хомогенатима одабраних можданих структура (*Navarro-Gonzalez JA, 1998*). Одређивање концентрације  $NO_2 + NO_3$  се заснива на спектофотометријској детекцији промене интензитета боје која настаје у реакцији нитрита са *Griess*-овим реагенсом. Како *Griess*-ов реагенс не реагује са нитратима који доминирају у односу на нитрите, било је потребно редуковати нитрате до нитрита.

*Реагенси:*

- Грануле кадмијума – гранулирани елементарни кадмијум; величина гранула од 100 mesh-а. Грануле кадмијума су чуване у 0,1 M раствору сулфатне киселине где су заштићене и стабилне најмање 9 месеци;
- Глицин-NaOH пуфер ( $pH=9,7$ )
- *Griess I* (0,346 mol/l сулфанилна киселина)
- *Griess II* (2,1 mmol/l нафтиламин)
- Стандардни раствор нитрата – добијен разблаживањем основног 0,1 M раствора  $NaNO_3$  (или  $KNO_3$ ) који је припремљен растварањем одговарајуће количине соли у раствору  $Na_2B_4O_7$  концентрације 10 mmol/l

*Поступак:*

Депротеинизација 150  $\mu\text{l}$  узорка је извршена са 14,5  $\mu\text{l}$  300 mM/l  $ZnSO_4$  и 17,5  $\mu\text{l}$  220 mM/l NaOH. Након преципитације у трајању од 10 минута, узорци су центрифугирани 15 минута

на 8000 обртаја/мин. Непосредно пре коришћења, извршена је активација кадмијума тако што су грануле кадмијума 3 пута испране дестилованом водом па потопљене у 5 mmol/l раствор  $\text{CuSO}_4$ , и мешане стакленим штапићем (3 - 4 минута) док није избледела плава боја бакра. Раствор  $\text{CuSO}_4$  је одливен, а грануле су 3 пута испране у глицин- NaOH пуферу. Након одливања пуфера, кадмијум је био активиран и спреман за коришћење тако што је по једна гранула стављена у слепу пробу (150  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  + 27  $\mu\text{l}$  глицин - NaOH пуфер), стандарде (5 – 50  $\mu\text{mol/l}$   $\text{NaNO}_3$  у 10 mmol/l  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 + \text{H}_2\text{O}$  до 150  $\mu\text{l}$  + 27  $\mu\text{l}$  глицин - NaOH пуфер) и узорке (150  $\mu\text{l}$  супернатанта + 27  $\mu\text{l}$  глицин - NaOH пуфер) и све инкубирано у трајању од 15 минута. По 100  $\mu\text{l}$  раствора из сваке епрувете је наливено у плочу ELISA спектрофотометра, а затим додато 100  $\mu\text{l}$  *Griess I* и 100  $\mu\text{l}$  *Griess II*, па инкубирано 15 минута. Вредност апсорбанце стандарда и узорака у односу на слепу пробу је читана на таласној дужини од 492/650 nm, а концентрација  $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$  је изражена у nmol/mg протеина.

### 8.3. Одређивање концентрације тиобарбитурна киселина (*TBA*)-реагујућих супстанци (*TBARS*) у хомогенатима ткива

Малондиалдехид (енг. *Malondialdehyde*; *MDA*) се користи за процену степена липидне пероксидације. Детектује се у реакцији са тиобарбитурном киселином (енг. *Thiobarbituric acid* - *TBA*) у киселој средини, када настаје комплекс јако жуте боје који се мери спектрофотометријски.

#### *Реагенси:*

- Стандарди *MDA* разблажени у  $\text{H}_2\text{O}$ : 10, 50, 100, 150 и 200  $\mu\text{M/l}$  *MDA*
- *Реакциона смеша* - *TBA* реагенс (15% трихлорсирћетна киселина, 0,375% тиобарбитурна киселина; *TBA* и 0,25 mol/l хлороводонична киселина)

#### *Поступак:*

У разблажене хомогенате (50  $\mu\text{l}$  узорка и 150  $\mu\text{l}$  дестиловане  $\text{H}_2\text{O}$  -  $\text{dH}_2\text{O}$ ) и слепу пробу (200  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$ ) је додато 400  $\mu\text{l}$  *TBA* реагенса и инкубирано 5 минута на температури од 95 °C у воденом купатилу. Након хлађења извршено је центрифугирање 1 минут на 3000 обртаја/мин. и по 300  $\mu\text{l}$  супернатанта разливано у плочу. Вредност апсорбанце је измерена у односу на слепу пробу на таласној дужини од 492 nm, а вредност изражена у nmol/mg протеина.

### 8.4. Одређивање активности укупне супероксид дизмутазе (*tSOD*)

Ензим *SOD* катализује реакцију неутралисања  $\text{O}_2^{\bullet-}$  и активност *tSOD* се заснива на њеној способности да инхибира спонтану аутооксидацију адреналина у базној средини на  $\text{pH}=10,2$  (172).

*Реагенси:*

- 50 mM бикарбонатни пуфер ( $pH=10,2$ ) са 1mM EDTA: 3, 28569 g  $Na_2CO_3$ , 1,624165 g  $NaHCO_3$  и 0,037224 EDTA допунити са  $dH_2O$  до 1 литра
- Адреналин (Л-епинефрин) 0,01 mM: 18,32 mg адреналина растворено у 10 ml 0,01 N HCl

*Поступак:*

50  $\mu$ l узорка, односно 50  $\mu$ l  $H_2O$  (бланк) је пипетирано у 2,85 ml пуфера. Након тога је додато по 100  $\mu$ l адреналина у узорке и бланк и реакција је праћена кинетички (промена апсорбанце у времену; 5 – 8 минута) на таласној дужини од 480 nm. Вредност се изражава у интернационалним јединицама по милиграму протеина ( $U/mg$  протеина), при чему јединична вредност *SOD* представља количину ензима која доводи до 50% инхибиције аутооксидације адреналина у линеарном делу промене апсорбанце у минути.

#### 8.5. Одређивање активности каталазе (*CAT*)

Активност *CAT* се заснива на реакцији између амонијум молибдата и  $H_2O_2$  при чему настаје комплекс жуте боје који се детектује спектрофотометријски (173).

*Реагенси:*

- 0,1 M натријум фосфатни пуфер,  $pH=7,0$
- 65  $\mu$ mol/ml  $H_2O_2$  у 6,0 mM Na-K фосфатном пуферу,  $pH=7,2$
- Na фосфатни пуфер,  $pH=7,5$
- 32,4 mM амонијум молибдат

*Поступак:*

Нула апарата је подешена са 1,2 ml Na фосфатног пуфера  $pH=7,5$  (бланк). У 0,1 ml узорка, односно 0,1 ml Na-K фосфатног пуфера (контрола) је додато 0,5 ml  $H_2O_2$  раствореног у Na-K фосфатном пуферу и инкубирано 1 минут. Реакција је заустављена додавањем 0,5 ml амонијум молибдата у контролу и узорке. Апсорбанца је читана у односу на бланк на таласној дужини од 405 nm. Активност *CAT* је изражена у интернационалним јединицама по милиграму протеина ( $U/mg$  протеина), при чему јединица активности представља број микромолова  $H_2O_2$  редукованих у минути ( $\mu$ mol  $H_2O_2$ /мин).

#### 8.6. Одређивање садржаја укупног глутатиона (*GSH*)

Метода одређивања садржаја *GSH* у ткиву се заснива на мерењу 5'тио-2-нитробензоичне киселине (TNB) која је пропорционална укупној концентрацији *GSH* и детектује се спектрофотометријски.

*Реагенси:*

- Na-фосфатни пуфер,  $pH=7,5$ ; 0,143 M; 6,3 mM EDTA (шток)
- радни пуфер: 0,248 mg NADPH/ml штока
- 6 mM DTNB у штоку
- Глутатион редуктаза; 266 U/ml штока
- Стандарди GSH растворени у штоку (5, 10, 15, 20 и 25  $\mu$ M)

*Поступак:*

Поступак подразумева припрему реакционе смеше од 700  $\mu$ l радног пуфера, 100  $\mu$ l DTNB и 175  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. У реакциону смешу се затим додаје редом 25  $\mu$ l узорка и 10  $\mu$ l глутатион редуктазе. Након инкубације од 7 минута прати се кинетика (промена апсорбанце у трајању од 5 минута) у стакленој микрокивети на таласној дужини од 412 nm, а садржај GSH изражава се у nmol/mg протеина.

#### 8.7. Одређивање садржаја укупних сулфхидрилних група (SH)

Укупни сулфхидрилни садржај у хомогенатима ткива, одређен је Елмановом методом (174) која се заснива на реакцији DTNB са алифатичним тиол једињењима на  $pH=9$ , при чему настаје један мол *p*-нитрофенол анјона по једном молу тиола.

*Реагенси:*

- 0,2 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 2 mM EDTA растворено у H<sub>2</sub>O,  $pH=9$
- 0,01 M DTNB растворене у 0,05 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  $pH=7$

*Поступак:*

Поступак подразумева припрему реакционе смеше која се састоји од 900  $\mu$ l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> пуфера, 20  $\mu$ l DTNB и 50  $\mu$ l узорка, односно 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O за бланк, док слепа проба садржи само 950  $\mu$ l пуфера и 20  $\mu$ l DTNB. Након инкубације 25 минута на собној температури, апсорбанца је очитана према слепој проби на таласној дужини од 412 nm, а садржај SH изражен у  $\mu$ mol/mg протеина.

#### 8.8. Одређивање нивоа активности нуклеарног фактора 2 (NRF2)

Експресија нивоа нуклеарног фактора 2 (NRF2) кодираног NFE2L2 геном у хомогенатима ткива одређена је помоћу комерцијалног кита (Rat Nfe2l2 – Nuclear Factor, Erythroid Derived 2 like Protein 2, ELISA Kit; каталошки број ER0666; Wuhan Fine Biotech Co., Вухан, Кина).

*Реагенси:*

- лиофилизовани стандард у одговарајућем разблажењу (15,625-1000 pg/ml)
- примарно антитело (обележено биотином)
- *HRP*-стрептавидин коњугат
- 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (*TMB*) супстрат
- раствор за заустављање реакције
- пуфер за испирање (25x)

*Поступак:*

На почетку теста су припремљени стандарди у одговарајућим концентрацијама, а микроплоча је пре почетка рада испрана два пута пуфером за испирање. У запремини од 100  $\mu$ l по бунару, у плочу су наливени контрола, стандарди и узорци и инкубирани 90 минута на температури од 37° C. Након два испирања извршена је инкубација са 100  $\mu$ l примарног антитела у трајању од 60 минута на 37° C, а после три узаступна испирања, извршена је инкубација са 100  $\mu$ l *HRP*-стрептавидин коњугатом 30 минута на 37° C. Потом је плоча испрана пет пута и инкубирана 15 – 30 минута на 37° C са 90  $\mu$ l *TMB* супстрата. Тест се завршава додавањем 50  $\mu$ l раствора за заустављање реакције, након чега је апсорбанца прочитана на таласној дужини од 450 nm, а вредности изражене у pg/mg протеина.

#### 8.9. Одређивање концентрације 8-хидрокси-2'-деоксигуаносина (*8-OHdG*)

Концентрација *8-OHdG* у хомогенатима ткива мозга, је одређена помоћу комерцијалног кита (*8-OHdG; 8-Hydroxydeoxyguanosine ELISA Kit*; каталошки број *E-EL-0028; Elabscience.*, Вухан, Кина).

*Реагенси:*

- референтни стандард у одговарајућем разблажењу (1,56-100 ng/ml)
- примарно антитело (обележено биотином)
- *HRP* коњугат
- супстрат
- раствор за заустављање реакције
- пуфер за испирање (25x)

*Поступак:*

У запремини од 50  $\mu$ l у микроплочу су наливени стандарди и узорци и инкубирани примарним антителом 45 минута на температури од 37° C. Плоча је затим испрана три пута са 350  $\mu$ l пуфера за испирање. Након инкубације са 100  $\mu$ l *HRP* коњугата у трајању од 30 минута на 37° C, плоча је испрана пет пута и инкубирана са 90  $\mu$ l супстрата 15 минута на 37° C. Поступак се завршава додавањем 50  $\mu$ l раствора за заустављање реакције, након чега је апсорбанца прочитана на таласној дужини од 450 nm, а вредности изражене у ng/mg протеина.

#### 8.10. Одређивање концентрације протеина одговора на рани фактор раста 1 (*EGR1*)

Концентрација *EGR1* (енг. *Early Growth Response Protein 1*) у хомогенатима ткива, је одређена помоћу комерцијалног кита (*Rat EGR1; Early Growth Response Protein 1 ELISA Kit*; каталошки број *ER0916; Wuhan Fine Biotech Co.*, Вухан, Кина).

##### *Реагенси:*

- лиофилизовани стандард у одговарајућем разблажењу (6,25-400 pg/ml)
- примарно антитело (обележено биотином)
- *HRP*-стрептавидин коњугат
- *TMB* супстрат
- раствор за заустављање реакције
- пуфер за испирање (25x)

##### *Поступак:*

На почетку теста су припремљени стандарди у одговарајућим концентрацијама, а микроплоча је испрана два пута пуфером за испирање. У запремини од 100 µl по бунару, у плочу су наливени стандарди и узорци и инкубирани 90 минута на температури од 37° C. Након два испирања извршена је инкубација са 100 µl примарног антитела у трајању од 60 минута на 37° C, а после три испирања, извршена је инкубација са 100 µl *HRP*-стрептавидин коњугатом 30 минута на 37° C. Потом је плоча испрана пет пута и инкубирана 10 – 20 минута на 37° C са 90 µl *TMB* супстрата. Поступак је завршен додавањем 50 µl раствора за заустављање реакције, након чега је апсорбанца очитана на таласној дужини од 450 nm, а вредности изражене у pg/mg протеина.

### IV 9. ОДРЕЂИВАЊЕ АМИЛОИДНИХ ПРОТЕИНА

#### 9.1. Одређивање концентрације амилоидног прекурсорског протеина (*APP*)

Концентрација *APP* у хомогенатима ткива, је одређена помоћу комерцијалног кита (*Rat APP; Amyloid Precursor Protein ELISA Kit*; каталошки број *E-EL-R2490; Elabscience.*, Вухан, Кина).

##### *Реагенси:*

- референтни стандард у одговарајућем разблажењу (1,56-100 ng/ml)
- примарно антитело (обележено биотином)
- *HRP* коњугат
- супстрат
- раствор за заустављање реакције
- пуфер за испирање (25x)



### *Поступак:*

У запремини од 100  $\mu\text{l}$  по бунару, у микроплочу су наливени стандарди и узорци и инкубирани 90 минута на температури од 37° C. У плочу је додато 100  $\mu\text{l}$  примарног антитета и инкубирано 60 минута на температури од 37° C. Након испирања три пута, додато је 100  $\mu\text{l}$  *HRP* коњугата и инкубирано 30 минута на 37° C. Плоча је пет пута испрана пуфером за испирање и инкубирана са 90  $\mu\text{l}$  супстрата 15 минута на 37° C. Поступак је завршен додавањем 50  $\mu\text{l}$  раствора за заустављање реакције, након чега је апсорбанца очитана на таласној дужини од 450 nm, а вредности изражене у ng/mg протеина.

## 9.2. Одређивање концентрације $\beta$ амилоида ( $A\beta_{1-42}$ )

Концентрација  $A\beta_{1-42}$  у хомогенатима ткива, је одређена помоћу комерцијалног кита (*Rat A $\beta$  1-42; Amyloid Beta 1-42 ELISA Kit*; каталoшки број *E-EL-R1402; Elabscience.*, Вухан, Кина).

### *Реагенси:*

- референтни стандард у одговарајућем разблажењу (15,63-1000 pg/ml)
- примарно антитело (обележено биотином)
- *HRP* коњугат
- супстрат
- раствор за заустављање реакције
- пуфер за испирање (25x)

### *Поступак:*

У запремини од 100  $\mu\text{l}$  по бунару, у микроплочу су наливени стандарди и узорци и инкубирани 90 минута на температури од 37° C. Након додавања примарног антитета, извршена је инкубација 60 минута на температури од 37° C, затим је плоча испрана три пута. Након инкубације са 100  $\mu\text{l}$  *HRP* коњугата у трајању од 30 минута на 37° C, плоча је испрана пет пута и инкубирана са 90  $\mu\text{l}$  супстрата 15 минута на 37° C. Поступак је завршен додавањем 50  $\mu\text{l}$  раствора за заустављање реакције, након чега је апсорбанца очитана на таласној дужини од 450 nm, а вредности изражене у pg/mg протеина.

## IV 10. ОДРЕЂИВАЊЕ ЕКСПРЕСИЈЕ НЕУРОТРОФИЧНОГ ФАКТОРА МОЖДАНОГ ПОРЕКЛА (*BDNF*)

Експресија *BDNF* у хомогенатима ткива, је одређена помоћу комерцијалног кита (*Rat BDNF; Brain Derived Neurotrophic Factor, ELISA Kit*; каталoшки број *ER0008; Wuhan Fine Biotech Co.*, Вухан, Кина).

#### *Реагенси:*

- лиофилизовани стандард у одговарајућем разблажењу (31,25-2000 pg/ml)
- примарно антитело (обележено биотином)
- *HRP*-стрептавидин коњугат
- *TMB* супстрат
- раствор за заустављање реакције
- пуфер за испирање (25x)

#### *Поступак:*

На почетку теста су припремљени стандарди у одговарајућим концентрацијама, а микроплоча је пуфером за испирање испрана два пута. У запремини од 100  $\mu$ l по бунару, у плочу су наливени стандарди и узорци и инкубирани 90 минута на температури од 37° C. Након два испирања извршена је инкубација са 100  $\mu$ l примарног антитела у трајању од 60 минута на 37° C, а после три испирања, извршена је инкубација са 100  $\mu$ l *HRP*-стрептавидин коњугатом 30 минута на 37° C. Потом је плоча испрана пет пута и инкубирана 15 – 30 минута на 37° C са 90  $\mu$ l *TMB* супстрата. Поступак је завршен додавањем 50  $\mu$ l раствора за заустављање реакције, након чега је апсорбанца прочитана на таласној дужини од 450 nm, а вредности изражене у pg/mg протеина.

#### IV 11. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Студијски узорак је израчунат помоћу комерцијално доступног програма *GPower 3.1.*, за вероватноћу грешке типа I ( $\alpha = 0,05$ ) и снагу студије > 80%. Узимајући у обзир дизајн студије, значајност разлике унутар и између група, уз нормалну расподелу праћених параметара, утврђена је применом различитих модалитета анализе варијансе. Уз очекивану високу разлику вредности између пет експерименталних група (јачина ефекта 0,4), број јединки у свакој појединачној групи је био 13.

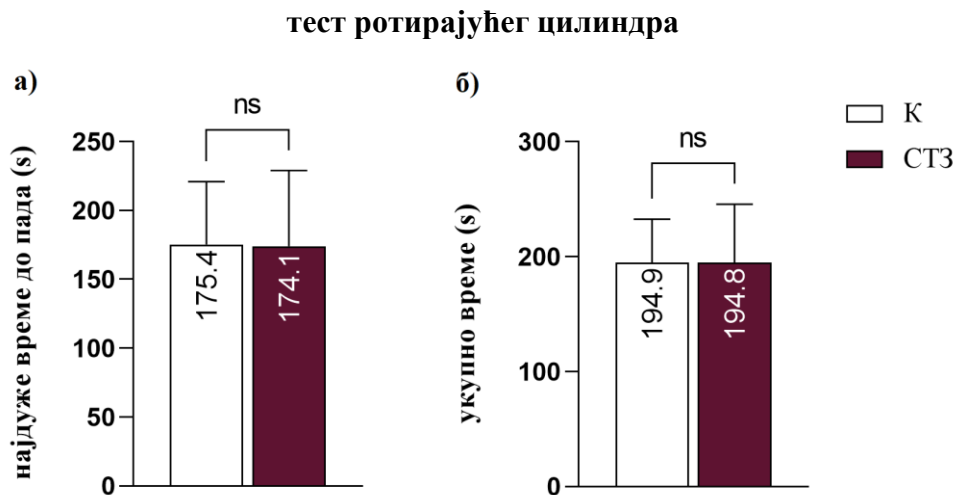
Добијене вредности су презентоване као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Након тестирања нормалности расподеле варијабли по групама, за утврђивање статистичке значајности су коришћени тестови: једносмерна анализа варијансе (ANOVA) са поновљеним мерењима и независни Студентов *t* тест за обележја са нормалном расподелом, као и *Kruskal-Wallis* и *Mann-Whitney* тестови за непараметарска обележја. За тестирање зависности између појединих варијабли коришћен је тест линеарне регресије уз утврђивање и тестирање *Pearson*-овог коефицијента корелације. Статистичка обрада добијених резултата вршена је помоћу комерцијалног програмског пакета *GraphPed Prism 9.00*. Статистичка значајност је одређена на  $p < 0,05$ .

## V РЕЗУЛТАТИ

### V 1. УТИЦАЈ *iTBS* НА БИХЕЈВИОРАЛНЕ ПРОМЕНЕ НАКОН ПРИМЕНЕ СТЗ

#### 1.1. Тест ротирајућег цилиндра

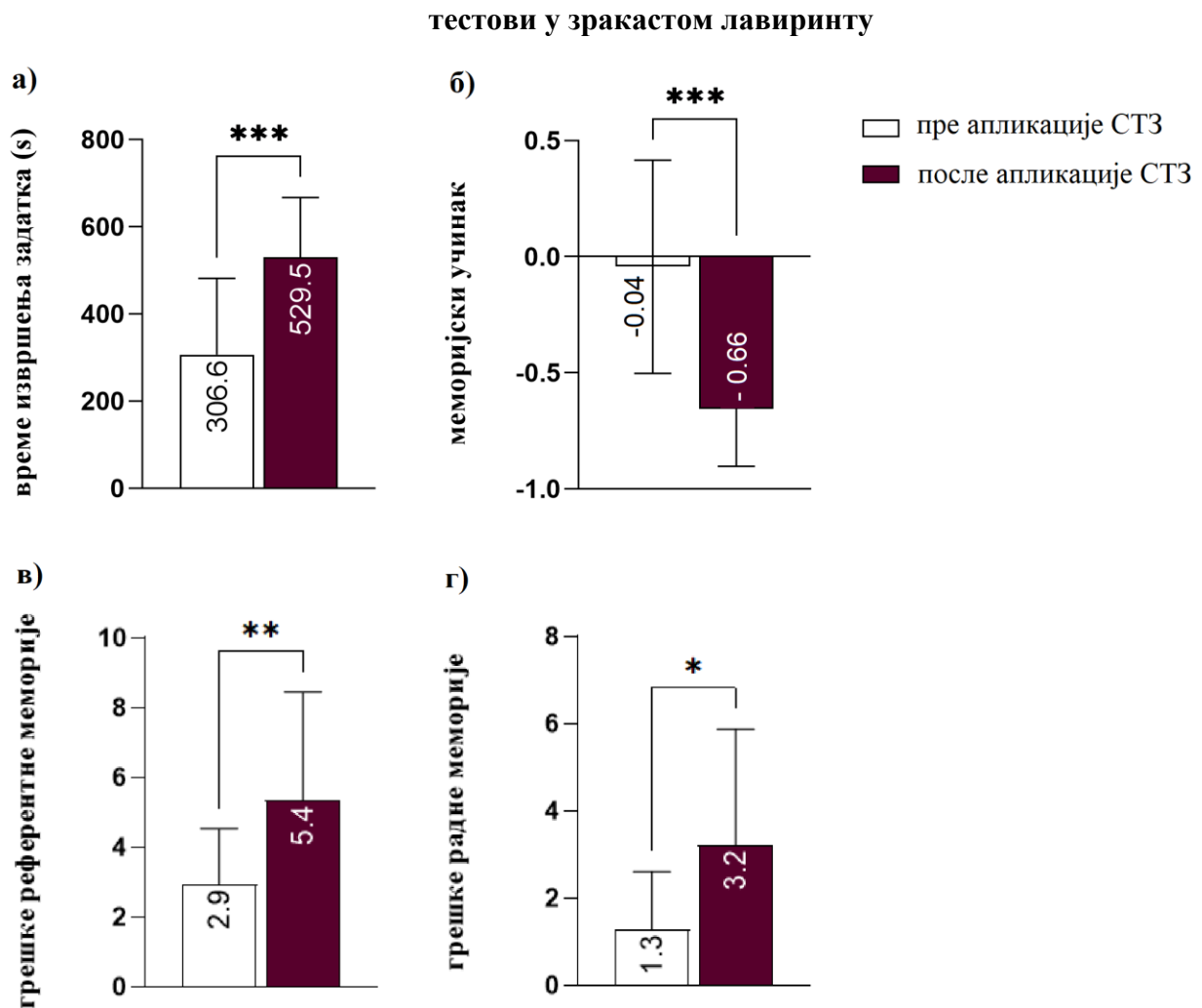
У циљу процене моторне координације и равнотеже, пре примене *iTBS* изведен је тест ротирајућег цилиндра 30 дана након СТЗ апликације. Користећи *t*-тест није уочена значајна разлика ( $p = 0,94$ ) у погледу најдуже времена проведеног на ротирајућем ваљку (Слика V 1.а) између групе која је примила физиолошки раствор ( $K = 175,4 \pm 45,56$  s) и групе која је примила стрептозотоцин (СТЗ =  $174,1 \pm 54,93$  s). Такође, у контексту укупног времена (Слика V 1.б) проведеног на ротирајућем ваљку не постоји статистички значајна разлика ( $p = 0,99$ ) између K ( $194,9 \pm 37,69$ ) и СТЗ групе ( $194,8 \pm 50,85$ ).



Слика V 1. Процена моторичких способности Wistar пацова 30 дана након примене стрептозотоцина (СТЗ). Најдуже време до пада (а) са ротирајућег ваљка представља најбољи резултат од 3 покушаја за групу која је примила физиолошки раствор (K), односно за групу која је примила СТЗ. Укупно време (б) проведено на ротирајућем ваљку представља најбољи резултат од 3 покушаја за K, односно СТЗ групу. Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Симбол ns означава да нема статистичке значајности.

## 1.2. Тестови у зракастом лавиринту – валидација експерименталног модела

У циљу валидације експерименталног модела, користећи *RAM* тест, упоређене су функције учења и памћења здравих животиња пре операције и 30 дана након операције (апликовања СТЗ). Неупарени *t*-тест је показао значајну разлику ( $p < 0,001$ ) у времену извршења задатка (Слика V 2.а) поређећи животиње пре ( $306,6 \pm 174,7$  s) и после ( $529,5 \pm 137,4$  s) операције. Значајна разлика ( $p < 0,001$ ) је уочена у меморијском учинку (Слика V 2.б) пре ( $-0,04 \pm 0,4595$ ) и након ( $-0,66 \pm 0,2458$ ) операције. Даље, статистички значајна разлика ( $p < 0,01$ ) у броју грешака референтне меморије (Слика V 2.в) је детектована поређењем група пре ( $2,9 \pm 1,6$ ) и после операције ( $5,4 \pm 3,1$ ). Такође, значајна разлика ( $p < 0,05$ ) постоји и у броју грешака радне меморије (Слика 5.2.г) поређењем група пре ( $1,3 \pm 1,326$ ) и после операције ( $3,2 \pm 2,665$ ).



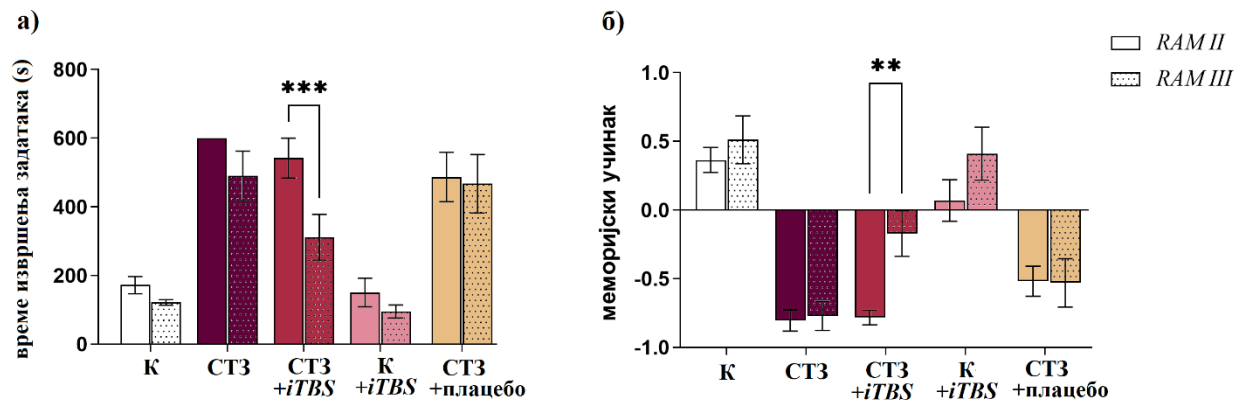
Слика V 2. Процена ефекта стрептозотоцина (СТЗ) на учење и памћење 30 дана након апликације. Тестови у зракастом лавиринту (*RAM*) пореде учење и памћење здравих животиња пре стереотаксичне операције, односно пре апликације СТЗ и 30 дана након апликације СТЗ. Време извршења задатка (а) представља време за које животиња помери сва четири мамца. Меморијски учинак (б) је однос тачних и нетачних улазака у краке, а

резултат представља скалу меморијског учинка са распоном од -1 до 1, где вредност 1 одражава савршен резултат када је животиња остварила само „тачне уласке“. Грешке референтне меморије (в) одражавају поновни улазак животиње у краке који никада нису садржали мамце, док грешке радне меморије (г) представљају поновљени улазак у краке где је мамац већ померен. Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Символи означавају статистички значајну разлику (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 1.3. Тестови у зракастом лавиринту – испитивање ефекта *iTBS*

Ефекат *iTBS* на учење и памћење испитиван је тестовима у зракастом лавиринту поређењем експерименталних група у две временске тачке: 1. пре стимулације (*RAM II*) и 2. после стимулације *iTBS* протоколом (*RAM III*). Примењена је двосмерна анализа варијансе са поновљеним мерењима (енгл. *Repeated Measures Two-Way Analysis of variance; ANOVA*). Ова анализа је показала значајан ефекат третмана ( $F_{(4,40)} = 2,55; p < 0,0001$ ; 63,42 % од укупне варијације) и времена ( $F_{(1,40)} = 4,49; p < 0,001$ ; 4,49 % од укупне варијације), док значајност њихове интеракције није уочена ( $p = 0,06$ ). Накнадна анализа применом Холм-Шидак теста показала је значајност између *СТЗ+iTBS* пре и након стимулације ( $p < 0,001$ ; Слика V 3.а). Слично, меморијски учинак је анализиран користећи *ANOVA* која је показала значајан ефекат третмана ( $F_{(4,40)} = 22,23 p < 0,0001$ ; 65,19 % од укупне варијације) и времена ( $F_{(1,40)} = 10,08; p < 0,01$ ; 3,64 % од укупне варијације), док значајност њихове интеракције није уочена ( $p = 0,058$ ). Накнадна анализа применом Холм-Шидак теста показала је значајност између *СТЗ+iTBS* пре и након стимулације ( $p < 0,01$ ; Слика V 3.б).

#### тестови у зракастом лавиринту

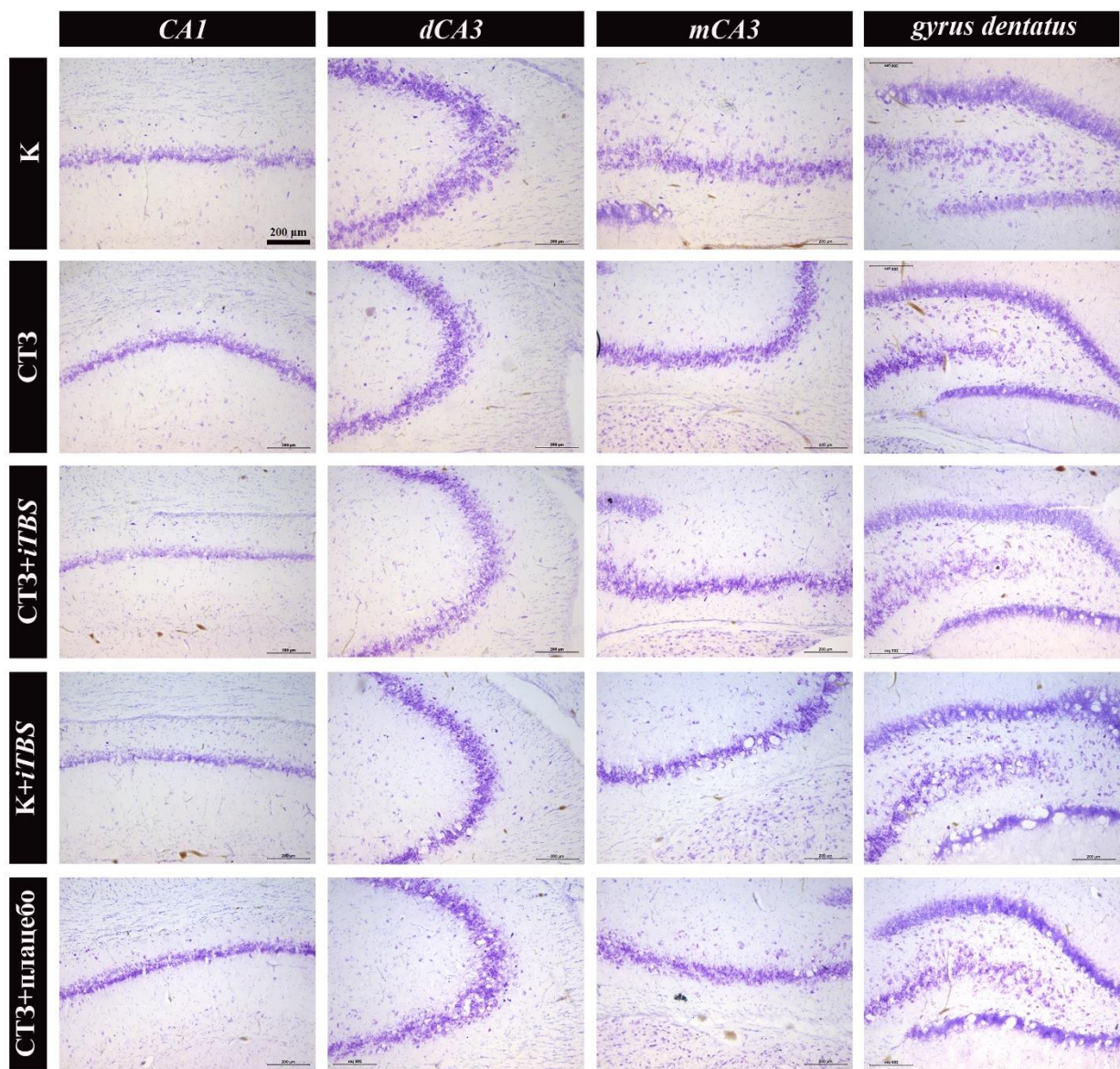


Слика V 3. Утицај *iTBS* на учење и памћење након примене стрептозотоцина (*СТЗ*). Ефекат *iTBS* је испитан поређењем параметара који одражавају учење и памћење добијених тестирањем у зракастом лавиринту пре (*RAM II*) и после (*RAM III*) *iTBS* третмана. Време извршења задатка (а) представља време за које животиња помери сва четири мамца. Меморијски учинак (б) је однос тачних и нетачних улазака у краке, а резултат представља скалу меморијског учинка са распоном од -1 до 1, где вредност 1 одражава савршен резултат када је животиња остварила само „тачне уласке“. Експерименталне групе К (ицв физиолошки раствор) и *СТЗ* (ицв *СТЗ*) су тестиране у лавиринту у претходно дефинисаним временским тачкама без примене *iTBS* третмана, за разлику од група *K+iTBS* и *СТЗ+iTBS* које су биле изложене *iTBS* третману између два тестирања, док је група *СТЗ+плацебо* била изложена само звуку апарата и контакту са експериментатором. Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Символи означавају статистички значајну разлику ( \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## V 2. УТИЦАЈ ITBS НА МОРФОЛОШКЕ ПРОМЕНЕ НАКОН ПРИМЕНЕ СТЗ

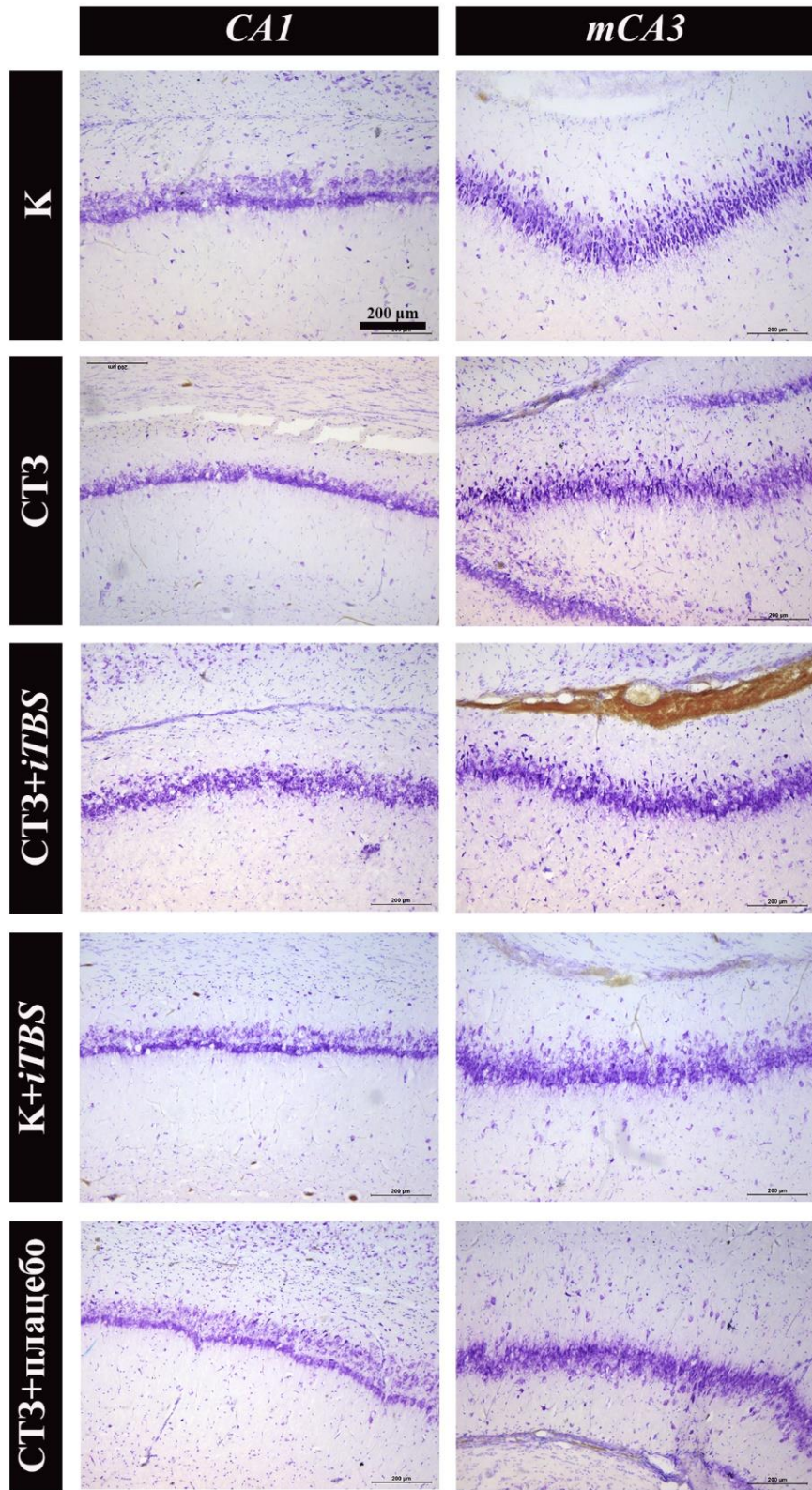
### 2.1. Хистохемијска анализа можданих пресека

Цитоархитектура одабраних региона мозга је анализирана коришћењем Нисловог (тионинског) бојења. Анализом дорзалних и вентралних делова хипокампуса из контролне групе животиња уочавају се здрави, густо збијени пирамидни и грануларни неурони у Амоновом рогу (лат. *cornu Ammonis*; CA) и у зубатој вијуги (лат. *gyrus dentatus*) што одражава очувану морфологију поменутих можданих структура (Слика V 4. и V 5.). У експерименталној групи која је третирана СТЗ, у дорзалном хипокампусу се не уочавају промене (Слика V 4.), док се у региону CA3 вентралног хипокампуса могу приметити малобројне некротичне ћелије праћене благом глиозом (Слика V 5.). У групама СТЗ+ITBS и СТЗ+плацебо присутне су ретке некротичне ћелије, с` тим што их је нешто више пронађено у плацебо групи (Слика V 5.). Посебна пажња је усмерена на перивентрикуларне регионе, јер се претпоставља да би због пута примене СТЗ ови региони могли бити највише погођени. Заиста, уочава се измењена неуронска морфологија у перивентрикуларној области, каудопутамену и медијалној хабенули можданих пресека у СТЗ и СТЗ+плацебо групама (Слика V 6.), док у кортикалним регионима нису откривене промене (Слика V 6.).

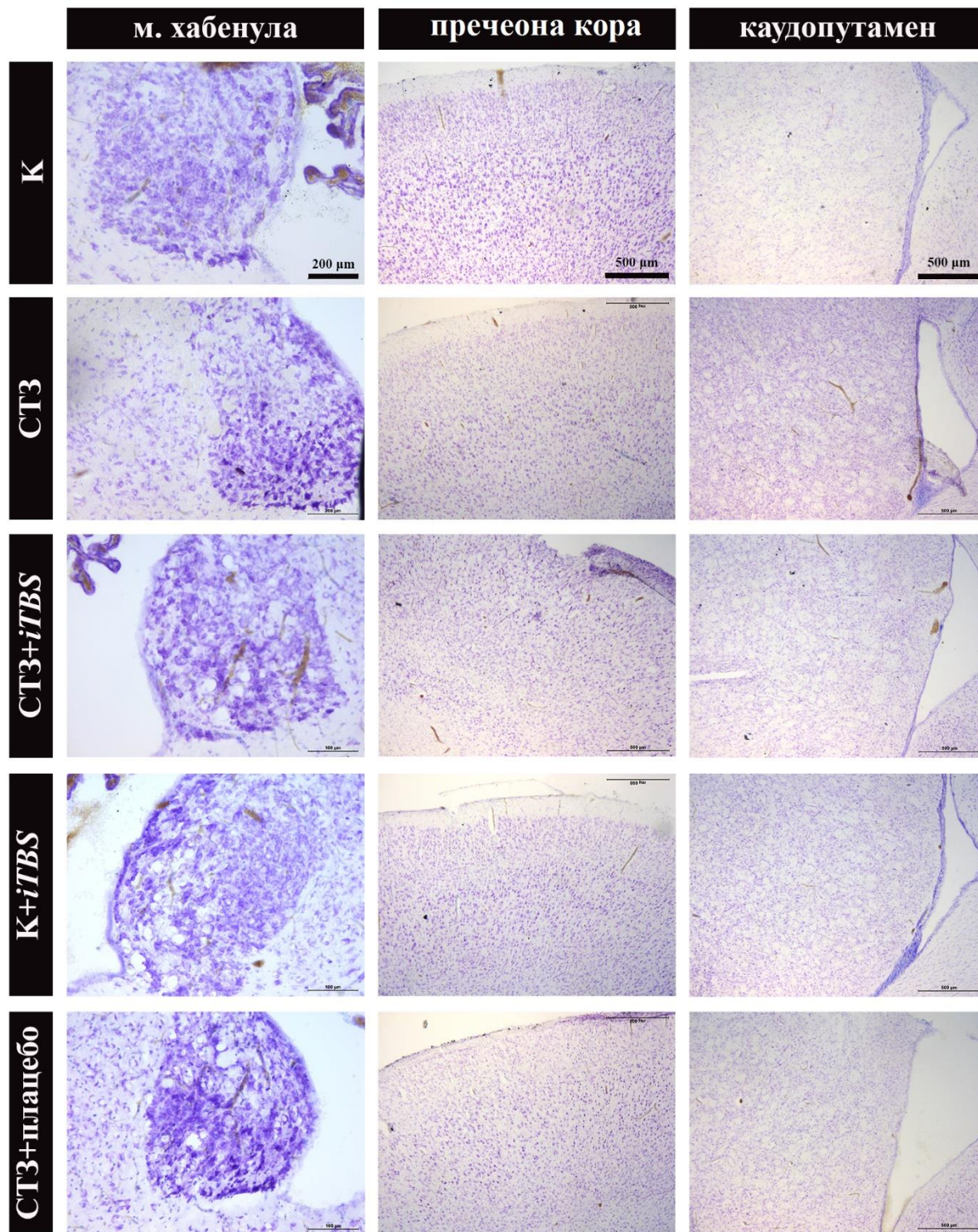


Слика V 4. Хистохемијско (Нислово) бојење дорзалног хипокампуса. Приказ региона хипокампуса: CA1, дорзални CA3 (*dCA3*), медијални CA3 (*mCA3*), и *gyrus dentatus* на увећању  $\times 10$ . Скала 200  $\mu\text{m}$ .





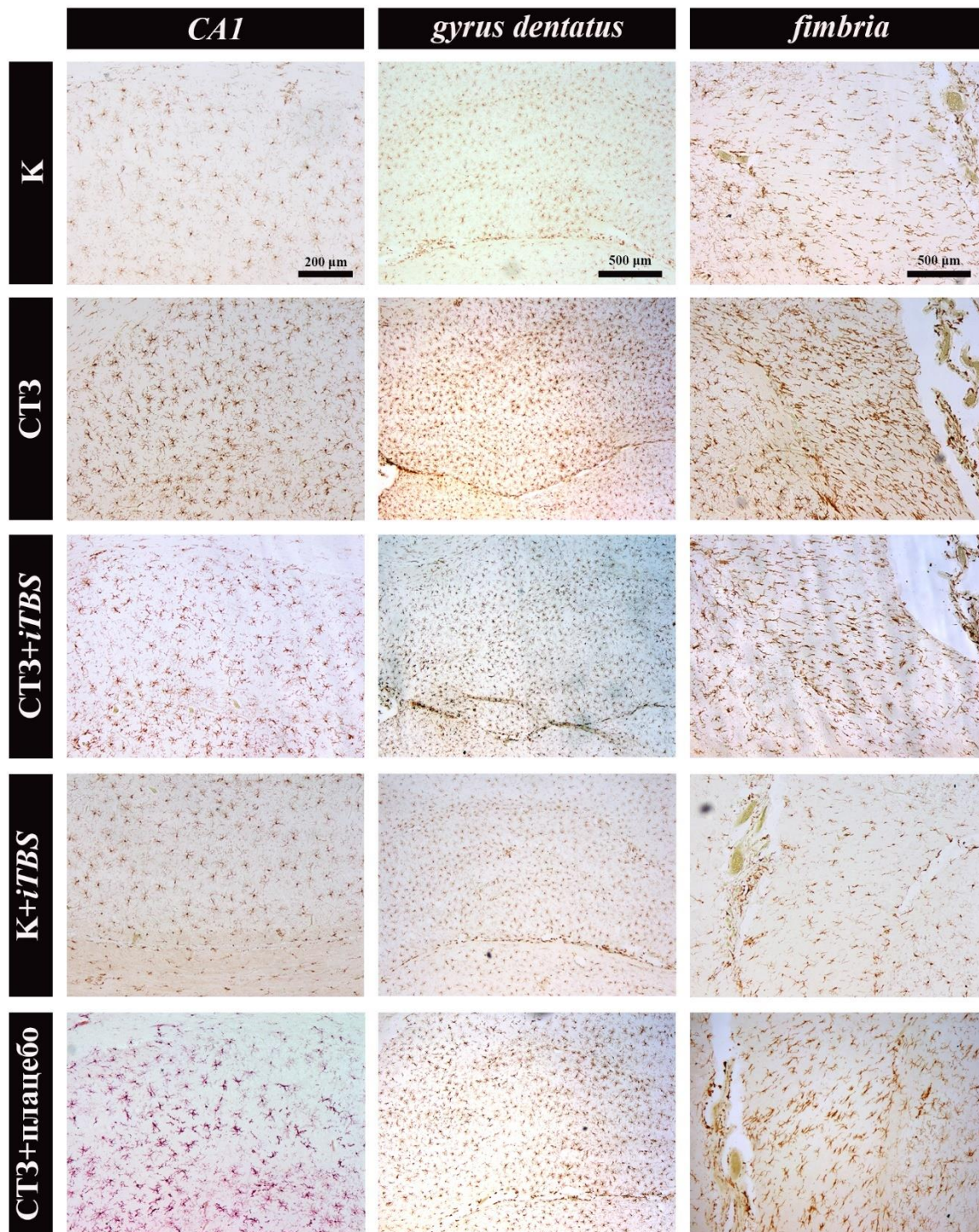
Слика V 5. Хистохемијско (Нислово) бојење вентралног хипокампуса. Приказ *CA1* и медијалног *CA3* (*mCA3*) региона хипокампуса на увећању  $\times 10$ . Скала 200  $\mu\text{m}$ .



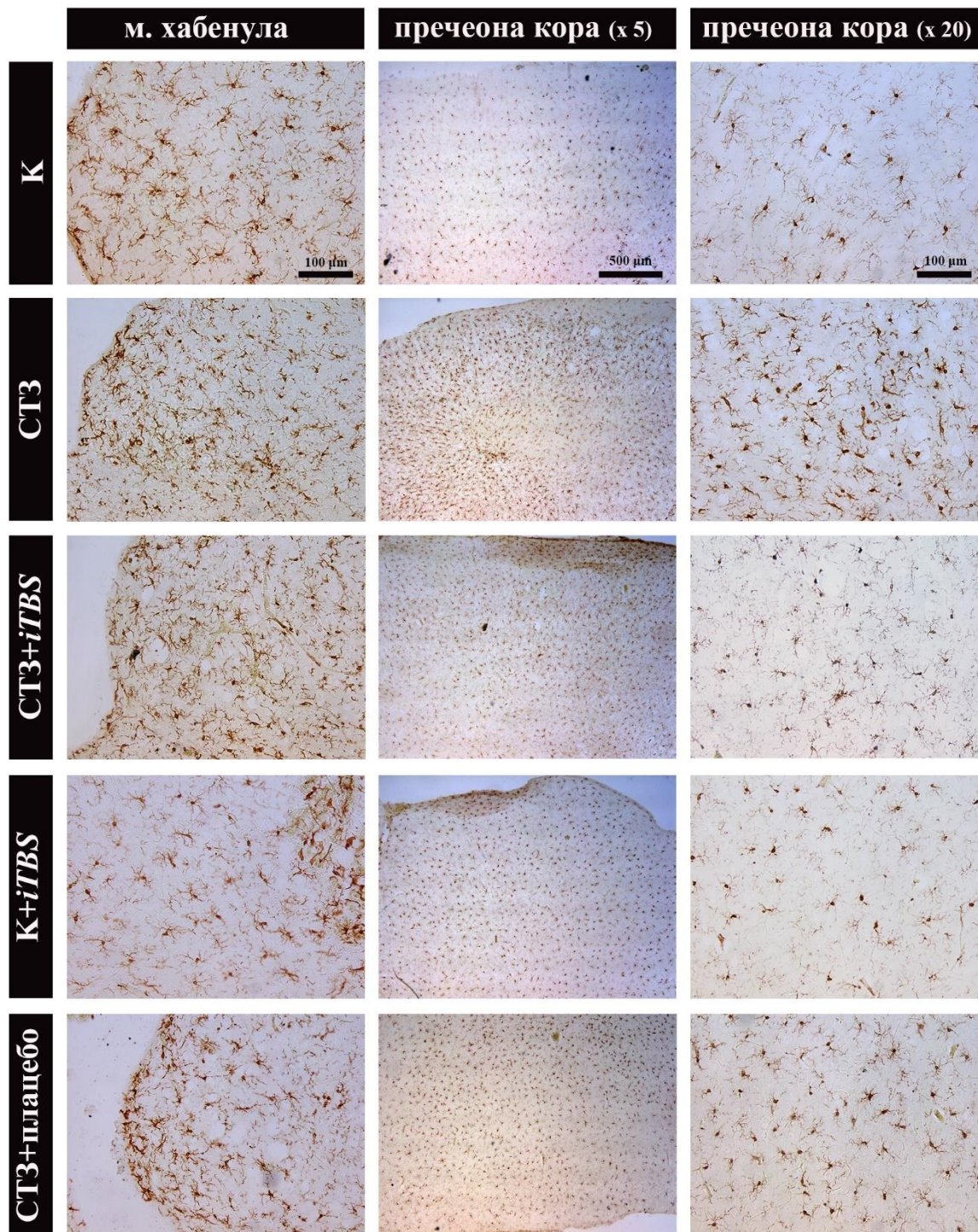
Слика V 6. Хистохемијско (Нислово) бојење медијалне хабенуле, пречеоне моздане коре и каудопутамена. За микрографије медијалне хабенуле (увећање x 20) скала 100  $\mu\text{m}$ , док је за микрографије пречеоне моздане коре и каудопутамена (увећање x 5) скала 500  $\mu\text{m}$ .

## 2.2. Имунохистохемијске промене у селективно осетљивим структурама мозга пацова

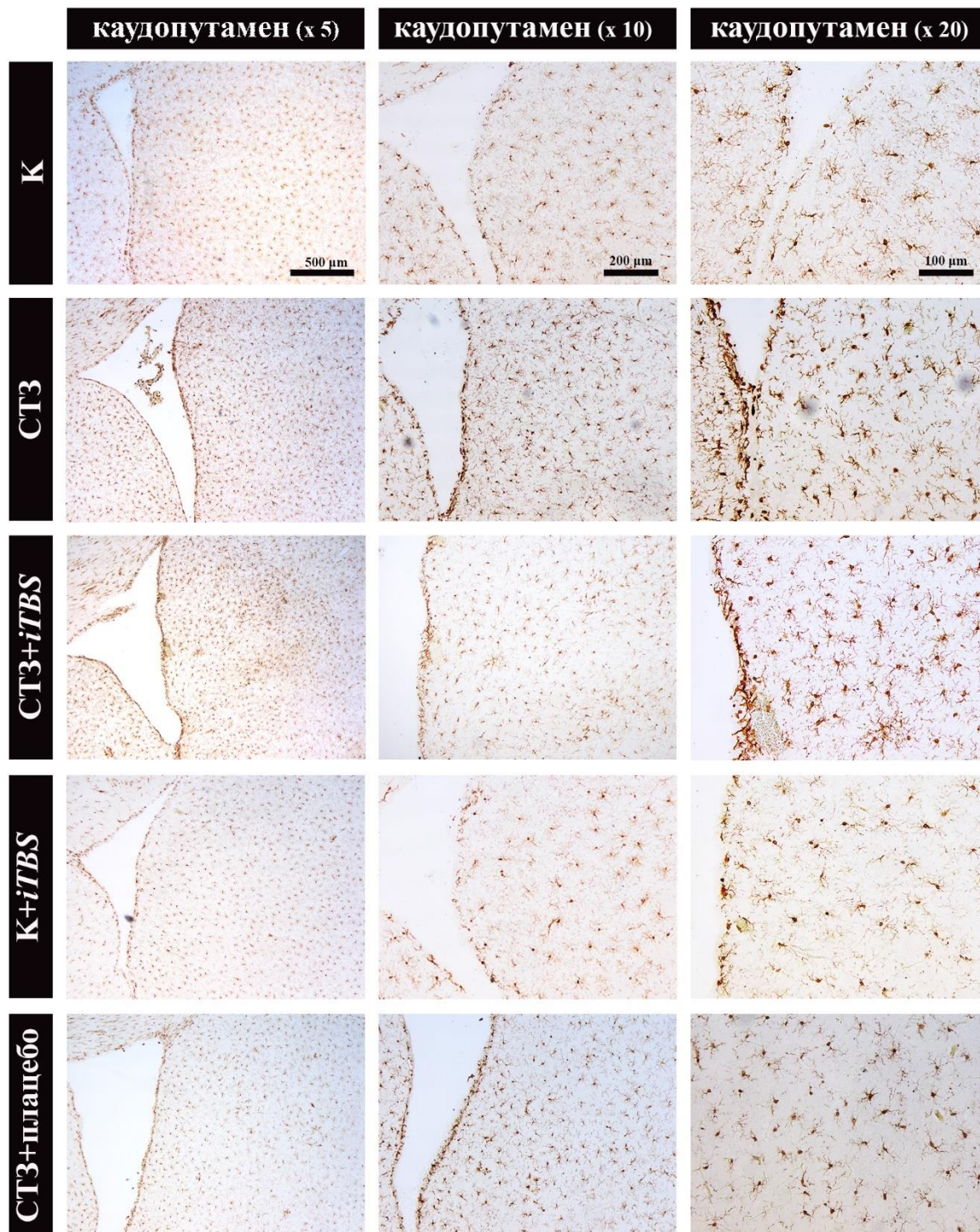
Имунохистохемијском анализом можданих пресека, вршено је испитивање регионалних промена у *Ibal*+ ћелијама (слике V 7, V 8. и V 9.). У свим можданим регионима здравих животиња, *Ibal*+ ћелије се карактеришу малим ћелијским телима и наставцима који се из тела ћелије гранају у свим правцима, што је карактеристична морфологија која одражава стање мировања. У експерименталним групама које су примиле СТЗ, у свим испитиваним регионима, примећен је благо активирани фенотип *Ibal*+ ћелија. Умерено активирани *Ibal*+ ћелије се уочавају у *gyrus dentatus*, *fimbria* и *CA1* региону дорзалног хипокампуса (Слика V 7.), медијалној хабенули и пречеоној можданој кори (Слика V 8.), као и у каудопутамену (Слика V 9.) након ицв СТЗ. Ове ћелије карактеришу благо увећана ћелијска тела и скраћени, задебљали наставци (слике V 7, V 8. и V 9.). Након *iTBS* третмана, примећује се квалитативно смањен интензитет бојења у свим регионима, док се ћелијска морфологија враћа ка фенотипу мировања (слике V 7, V 8. и V 9.). У погледу обрасца дистрибуције и фенотипа *Ibal*+ ћелија, нису примећене специфичне разлике између СТЗ и СТЗ+плацебо група (слике V 7, V 8. и V 9.).



Слика V 7. Утицај iTBS на стрептозотоцином (СТЗ) изазвану микроглиозу (*Iba1*+ ћелије) у дорзалном хипокампусу (енг. *ionized calcium binding adaptor molecule 1; Iba1*). За CA1 регион хипокампуса и *fimbria* (увећање x 10) скала је 500 μm, док је за *gyrus dentatus* (увећање x 5) скала 500 μm.



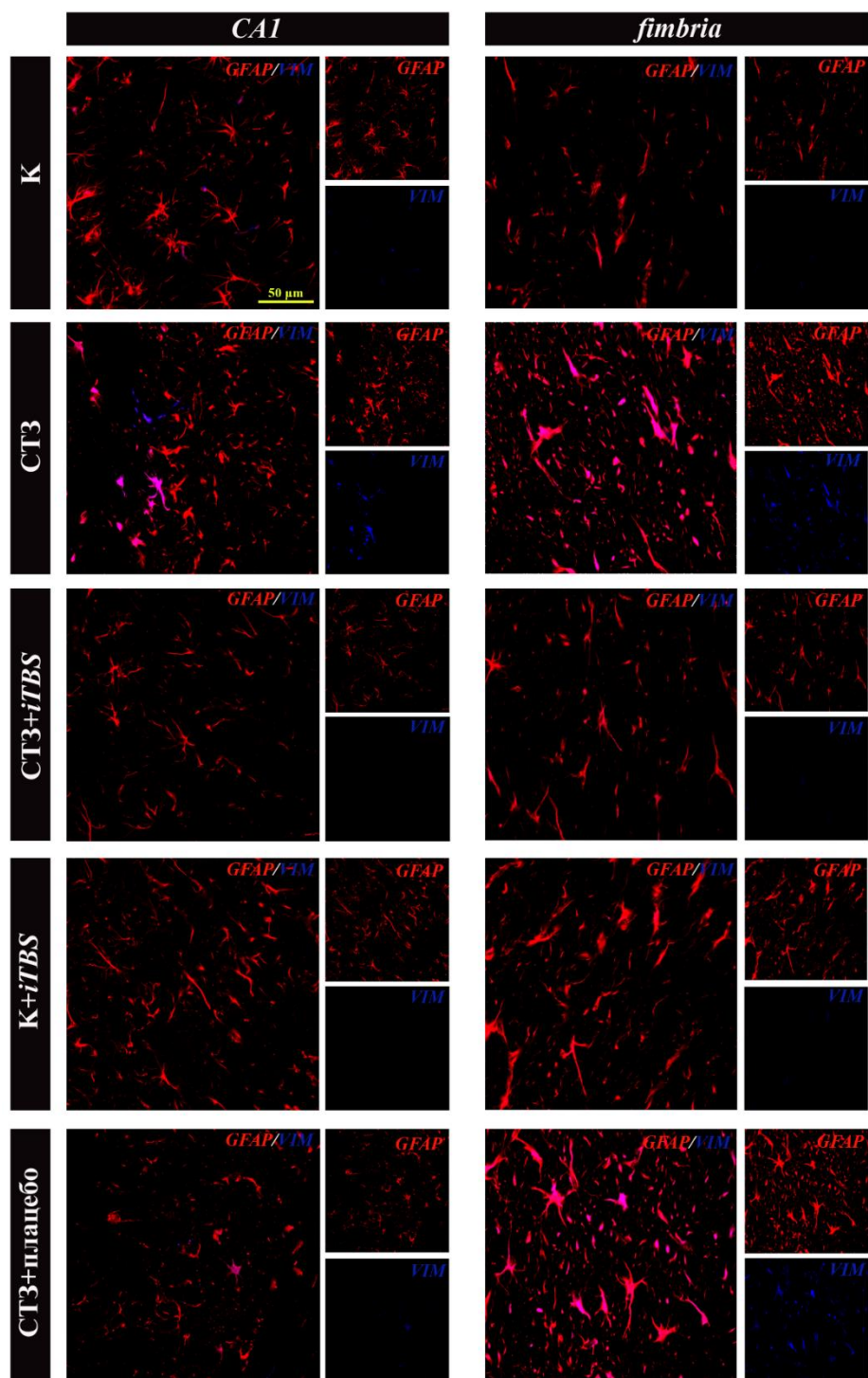
Слика V 8. Утицај iTBS на стрептозотоцином (СТЗ) изазвану микроглиозу (*Iba1*+ ћелије) у медијалној хабенули и пречеоној мозданој кори (енг. *ionized calcium binding adaptor molecule 1*; *Iba1*). За медијалну хабенулу (увећање x 20) скала је 100 μm, док је за пречеону кору (увећање x 5 и x 20) скала 500, односно 200 μm.



Слика V 9. Утицај iTBS на стрептозотоцином (СТЗ) изазвану микроглиозу (Iba1+ ћелије) у каудопутамену, односно региону у близини бочних комора (енг. *ionized calcium binding adaptor molecule 1*; Iba1). Коришћено је увећање x 5, x 10 и x 20, а скале су 500, 200 и 100  $\mu\text{m}$ .

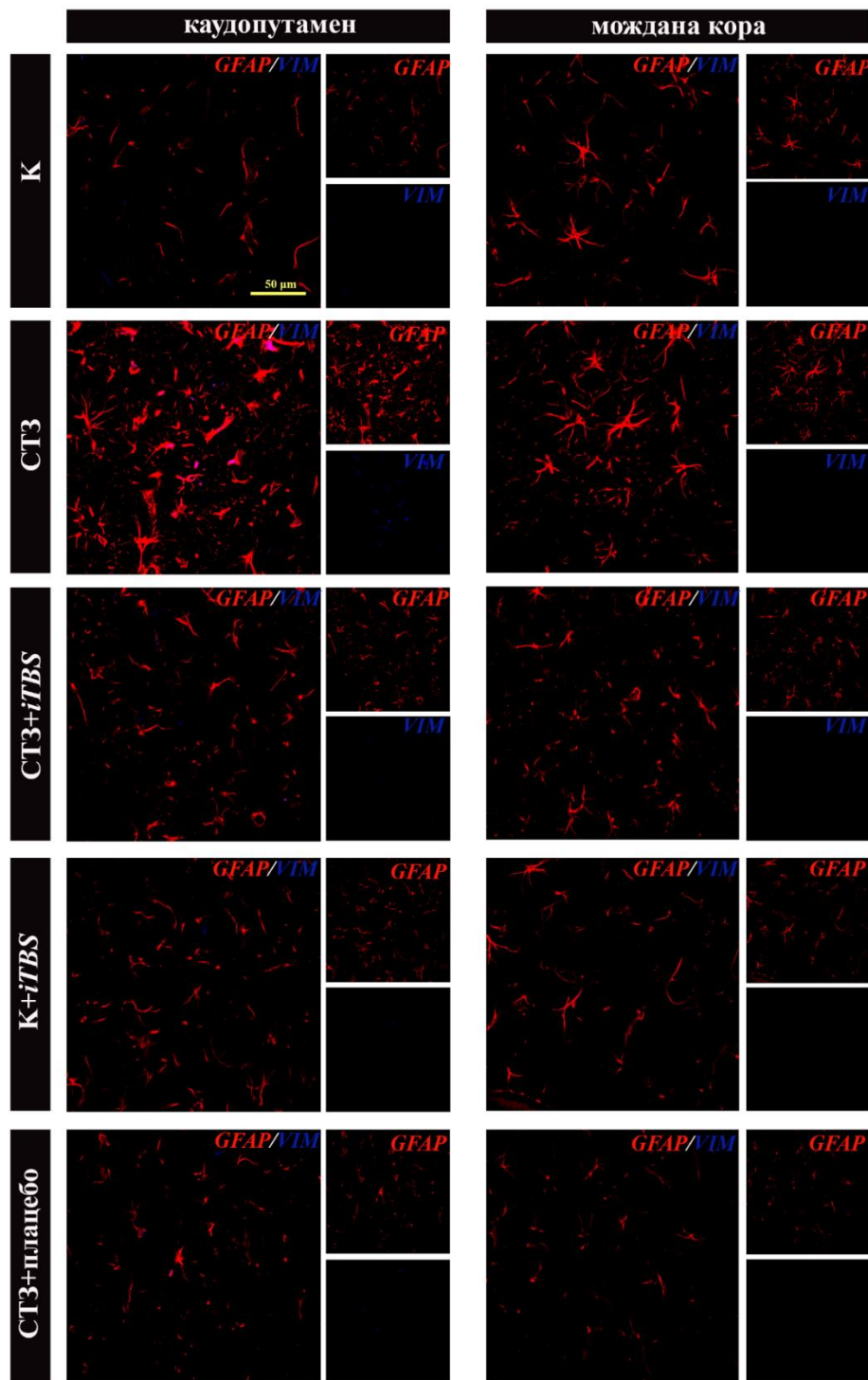
### 2.3. Процена утицаја *iTBS* на стрептозотоцином изазване имунофлуоресцентне промене у селективно осетљивим структурама мозга пацова

У циљу сагледавања регионалних промена на астроцитима након примене *iTBS* протокола на животињама којима је ицв апликован СТЗ, извршено је двоструко имунофлуоресцентно бојење усмерено на интермедијарне филаменте *GFAP* и *VIM*. У свим можданим регионима животиња из група К и К+*iTBS*, морфологија *GFAP*+ ћелија одражава стадијум мировања астроцита без очигледне колокализације са виментином, осим спорадичних *GFAP*+/*VIM*+ ћелија у хипокампусу (Слика V 10.). За разлику од здравих контрола, у свим испитиваним можданим регионима животиња из СТЗ групе, имунореактивност *GFAP*-а је била благо до умерено повећана унутар специфичних анатомских подручја, док су *GFAP*+/*VIM*+ ћелије детектоване у хипокампусу, прецизније *Stratum oriens CA1* региона и *fimbria* (Слика V10.). Такође, повећана реактивност, односно *GFAP*+/*VIM*+ колокализација је уочена и у перивентрикуларној области каудопутамена (Слика V 11.). У експерименталној групи СТЗ+плацебо, описана је морфологија благо реактивних астроцита у *CA1* региону хипокампуса, док је изразито испољена у *fimbria*. Након примене *iTBS* протокола у експерименталној групи СТЗ+*iTBS*, у хипокампусу (Слика V 10.) и перивентрикуларном региону каудопутамена (Слика V 11.) уочава се приметно смањење реактивности у поређењу са СТЗ групом у контексту смањене експресије *GFAP* и колокализације *GFAP*+/*VIM*+. Занимљиво је да у кортикалним областима нису откривене двоструке имунопозитивне ћелије (Слика V 11.).



Слика V 10. Утицај iTBS на стрептозотоцином (CT3) изазвану астроглиозу у хипокампусу (*Stratum oriens CA1* региона и *fimbria*). Двоструко имунофлуоресцентно бојење усмерено на глијални фибрилари кисели протеин; GFAP (црвено) и виментин; VIM (плаво). Микрографије су усликане на увећању  $\times 40$ , а скала је  $50\mu\text{m}$ .





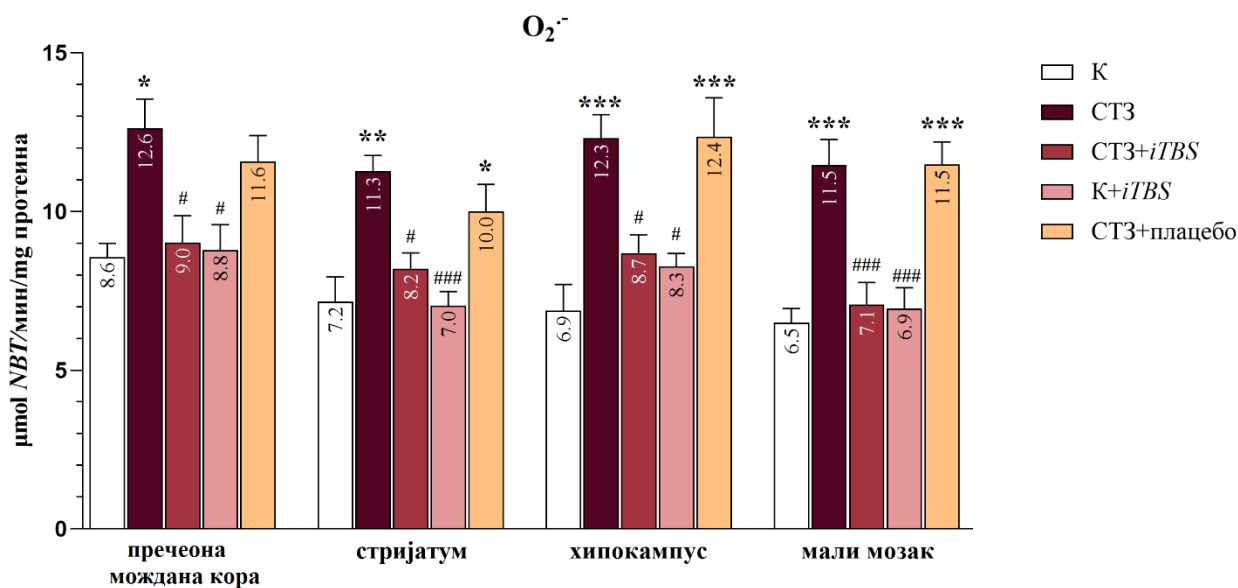
Слика V 11. Утицај *iTBS* на стрептозотоцином (СТЗ) изазвану астроглиозу у каудопутамену и пречној мозданој кори. Двоструко имунофлуоресцентно бојење усмерено на глијални фибриларни кисели протеин; GFAP (црвено) и виментин; VIM (плаво). Микрографије су усликане на увећању  $\times 40$ , а скала је  $50\mu\text{m}$ .

### V 3. УТИЦАЈ ITBS НА БИОХЕМИЈСКЕ ПАРАМЕТРЕ НАКОН ПРИМЕНЕ СТЗ

#### 3.1. Испитивање параметара оксидативног/ нитрозативног стреса и антиоксидативне заштите

##### 3.1.1. Ефекат *iTBS* на производњу $O_2^-$ након примене СТЗ у можданим структурама Wistar пацова

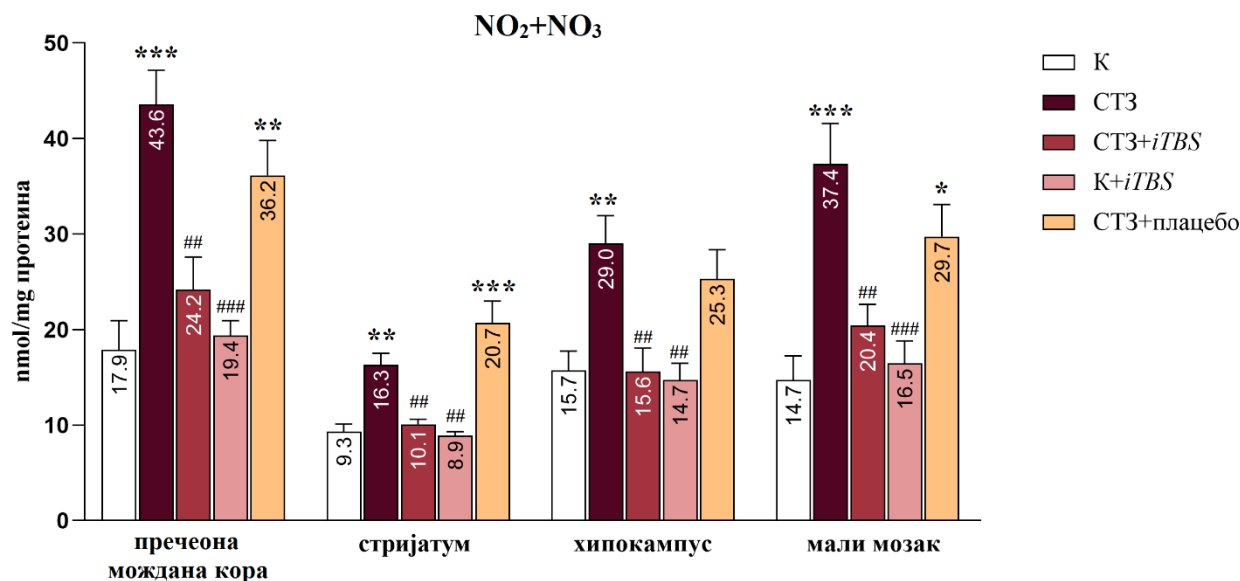
Апликација СТЗ код животиња доводи до повећаног стварања  $O_2^-$  у пречеоној можданој кори ( $p < 0,05$ ), стријатуму ( $p < 0,01$ ), хипокампусу ( $p < 0,001$ ) и малом мозгу ( $p < 0,001$ ). Са друге стране, примена *iTBS* на животиње третиране СТЗ-ом смањује производњу супероксидног анјона на контролни ниво у свим испитиваним структурама, док примена *iTBS* на здраве животиње нема утицај на продукцију супероксидног анјона. Међутим, примена плацебо терапије код СТЗ пацова повећава стварање  $O_2^-$  у односу на контролу, али нема утицаја на производњу  $O_2^-$  у поређењу са СТЗ групом животиња.



Слика V 12. Утицај *iTBS* на производњу супероксидног анјона ( $O_2^-$ ) након примене стрептозотоцина (СТЗ) у можданим структурама Wistar пацова. Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Символи означавају статистички значајну разлику у односу на контролну (К) групу (\*), и групу животиња која је примила СТЗ (#). (\*, #  $p < 0,05$ ; \*\*, ###  $p < 0,01$ ; \*\*\*, ####  $p < 0,001$ ).

### 3.1.2. Ефекат *iTBS* на концентрацију $NO_2+NO_3$ након примене СТЗ у можданим структурама Wistar пацова

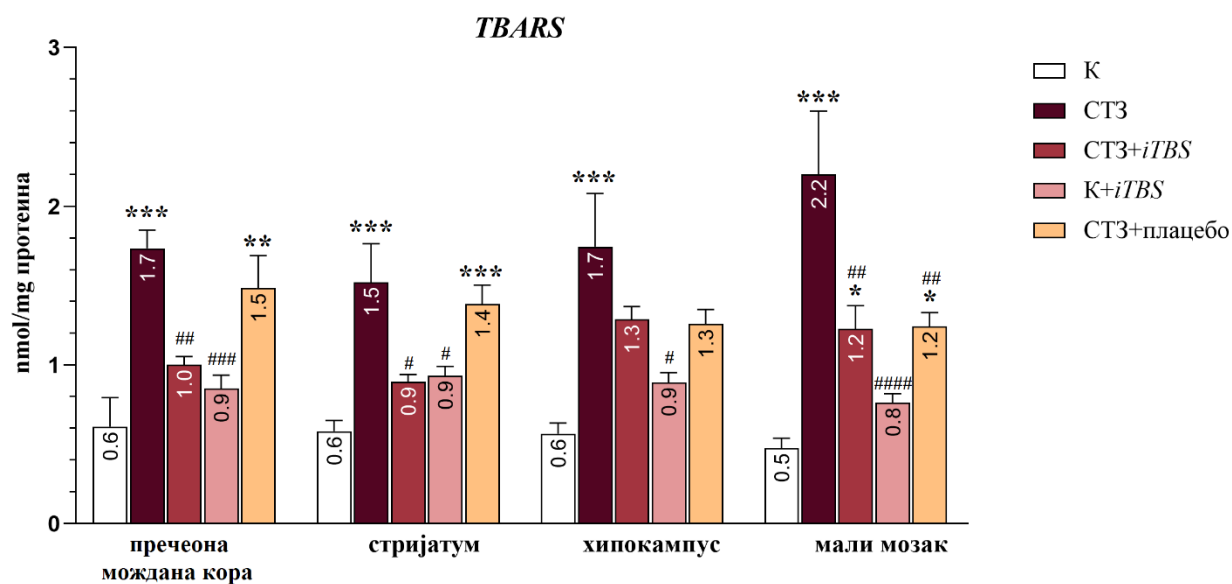
Примена СТЗ доводи до повећане концентрације  $NO_2+NO_3$  у пречеоној можданој кори и малом мозгу ( $p < 0,001$ ), као и стријатуму и хипокампусу ( $p < 0,01$ ). Након примене *iTBS*, садржај  $NO_2+NO_3$  се значајно смањује у свим испитиваним структурама ( $p < 0,01$ ). Даље, концентрација  $NO_2+NO_3$  остаје непромењена након примене *iTBS* на здравим животињама. Такође, плацебо терапија (СТЗ+плацебо) нема утицај на концентрацију  $NO_2+NO_3$  у односу на СТЗ групу у свим испитиваним структурама мозга.



Слика V 13. Утицај *iTBS* на садржај нитрата и нитрита ( $NO_2+NO_3$ ) након примене стрептозотоцина (СТЗ) у можданим структурама Wistar пацова. Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Символи означавају статистички значајну разлику у односу на контролну (К) групу (\*) и групу животиња која је примила СТЗ (#). (\*, #  $p < 0,05$ ; \*\*, ##  $p < 0,01$ ; \*\*\*, ###  $p < 0,001$ ).

### 3.1.3. Ефекат *iTBS* на концентрацију *TBARS* након примене *СТЗ* у можданим структурама *Wistar* пацова

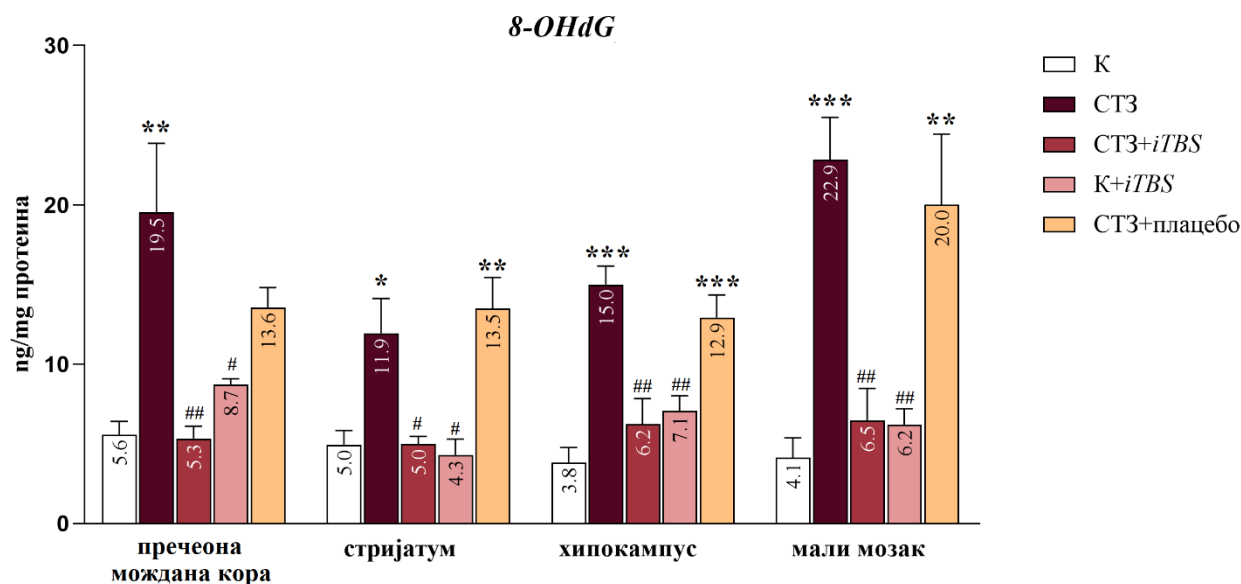
Апликација *СТЗ* код животиња доводи до повећане концентрације *TBARS* у пречеоној можданој кори, стријатуму, хипокампусу и малом мозгу ( $p < 0,001$ ), која се након примене *iTBS* значајно смањује у пречеоној можданој кори ( $p < 0,01$ ), стријатуму ( $p < 0,05$ ) и малом мозгу ( $p < 0,01$ ). Примена *iTBS* на здраве животиње нема утицаја на концентрацију *TBARS*. Осим смањене концентрације *TBARS* у малом мозгу ( $p < 0,05$ ), плацебо терапија (*СТЗ*+плацебо) нема утицаја на концентрацију *TBARS* у осталим можданим структурама у односу на *СТЗ* групу.



Слика V 14. Утицај *iTBS* на садржај тиобарбитурна киселина (*TBA*)-реагујућих супстанци (*TBARS*) након примене стрептозотоцина (*СТЗ*) у можданим структурама *Wistar* пацова. Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Симболи означавају статистички значајну разлику у односу на контролну (*К*) групу (\*) и групу животиња која је примила *СТЗ* (#). (\*, #  $p < 0,05$ ; \*\*, ##  $p < 0,01$ ; \*\*\*, ###  $p < 0,001$ ).

### 3.1.4. Ефекат *iTBS* на концентрацију 8-ОНдГ након примене СТЗ у мозданим структурама Wistar пацова

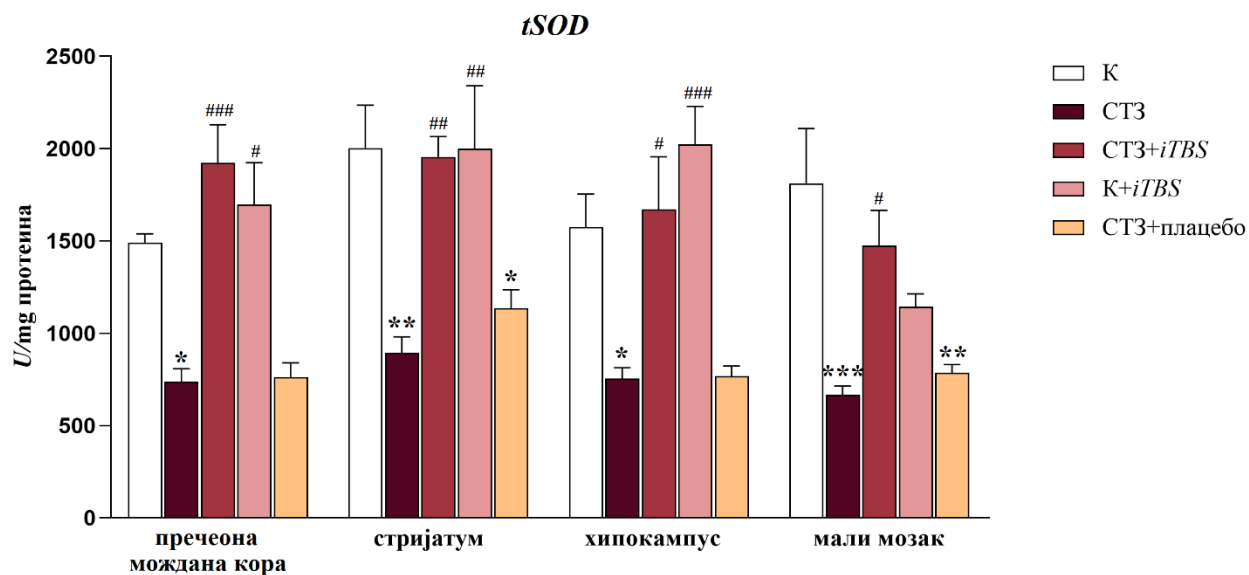
Примена СТЗ доводи до повећане концентрације 8-хидрокси-2'-деоксигуанозина (8-ОНдГ) у пречеоној мозданој кори ( $p < 0,01$ ), стријатуму ( $p < 0,05$ ), хипокампусу и малом мозгу ( $p < 0,001$ ), која се након *iTBS* третмана значајно смањује у свим испитиваним структурама. Даље, примена *iTBS* на здравим (контролним) животињама нема утицај на концентрацију 8-ОНдГ. Такође, плацебо терапија (СТЗ+плацебо) у односу на групу која је само третирана СТЗ-ом не утиче на концентрацију 8-ОНдГ.



Слика V 15. Утицај *iTBS* на концентрацију 8-хидрокси-2'-деоксигуанозина (8-ОНдГ) након примене стрептозотоцина (СТЗ) у мозданим структурама Wistar пацова. Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Символи означавају статистички значајну разлику у односу на контролну (К) групу (\*) и групу животиња која је примила СТЗ (#). (\*, #  $p < 0,05$ ; \*\*, ##  $p < 0,01$ ; \*\*\*, ###  $p < 0,001$ ).

### 3.1.5. Ефекат *iTBS* на активност *tSOD* након примене *CT3* у можданим структурама Wistar пацова

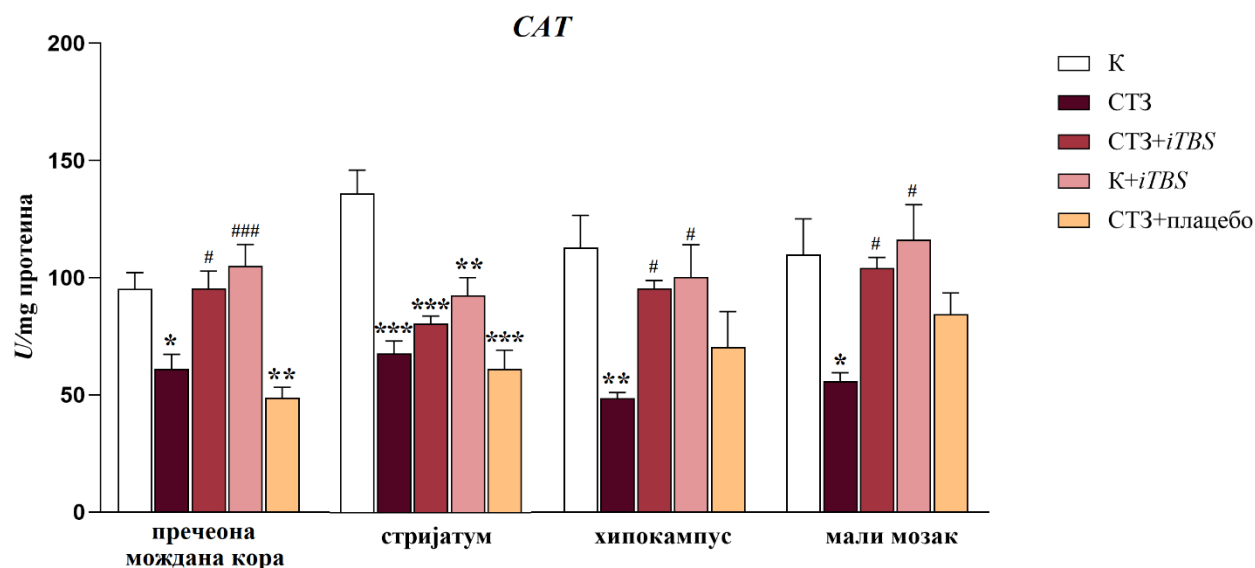
Примена *CT3* смањује активност *tSOD* у пречеаној можданој кори ( $p < 0,05$ ), стријатуму ( $p < 0,01$ ), хипокампусу ( $p < 0,05$ ) и малом мозгу ( $p < 0,001$ ) која се након примене *iTBS* враћа на контролни ниво у свим испитиваним структурама. Примена *iTBS* на здравим животињама нема утицаја на активност *tSOD*. Плацебо терапија (*CT3*+плацебо) такође нема утицаја на активност *tSOD* у односу на *CT3* групу.



Слика V 16. Утицај *iTBS* на активност укупне супероксид дисмутазе (*tSOD*) након примене стрептозотоцина (*CT3*) у можданим структурама Wistar пацова. Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Симболи означавају статистички значајну разлику у односу на контролну (К) групу (\*) и групу животиња која је примила *CT3* (#). (\*, #  $p < 0,05$ ; \*\*, ##  $p < 0,01$ ; \*\*\*, ####  $p < 0,001$ ).

### 3.1.6. Ефекат *iTBS* на активност *CAT* након примене *СТЗ* у можданим структурама *Wistar* пацова

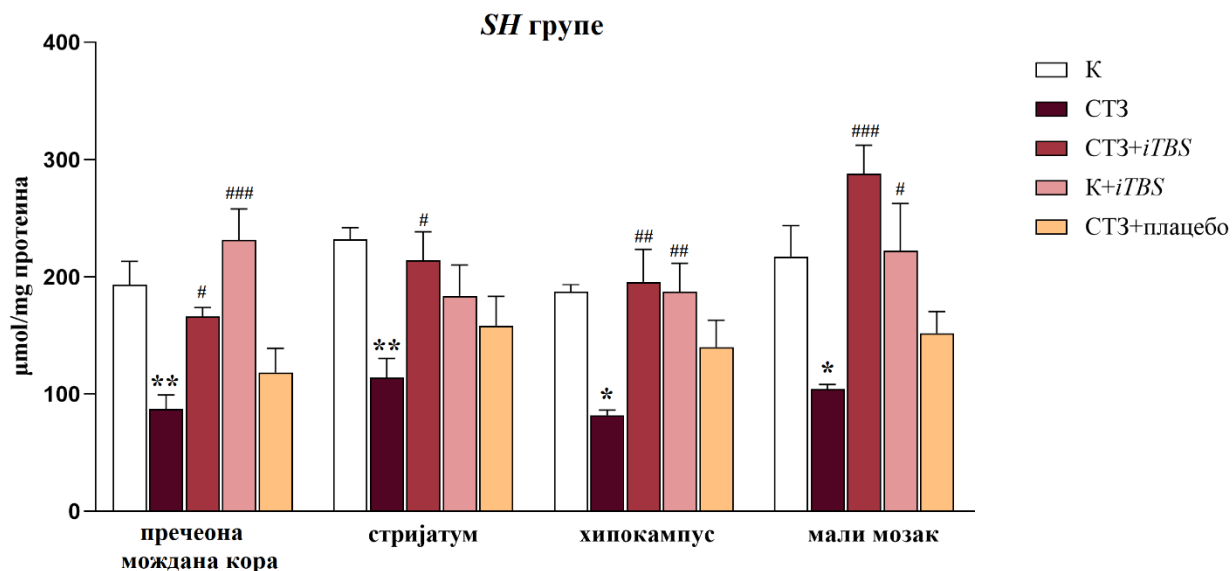
Апликација *СТЗ* доводи до смањене активности каталазе (*CAT*) у пречеоној можданој кори ( $p < 0,05$ ), стријатуму ( $p < 0,001$ ), хипокампусу ( $p < 0,01$ ) и малом мозгу ( $p < 0,05$ ). У свим можданим структурама осим у стријатуму, примена *iTBS* протокола код *СТЗ* животиња, значајно повећава активност *CAT* у односу на нестимулисане *СТЗ* животиње. Примена *iTBS* на контролним животињама нема утицаја на активности *CAT*, изузев у стријатуму где се уочава значајно смањење ( $p < 0,001$ ) у односу на контролну групу. Плацебо терапија (*СТЗ*+плацебо) нема утицај на активност *CAT* у односу на групу која је третирана само *СТЗ*-ом.



Слика V 17. Утицај *iTBS* на активност каталазе (*CAT*) након примене стрептозотоцина (*СТЗ*) у можданим структурама *Wistar* пацова. Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Символи означавају статистички значајну разлику у односу на контролну (*К*) групу (\*) и групу животиња која је примила *СТЗ* (#). (\*, #  $p < 0,05$ ; \*\*, ##  $p < 0,01$ ; \*\*\*, ####  $p < 0,001$ ).

### 3.1.7. Ефекат *iTBS* на садржај *SH* група након примене *CT3* у можданим структурама *Wistar* пацова

Апликација *CT3* доводи до значајног смањења концентрације сулфхидрилних (*SH*) група у пречеаној можданој кори и стријатуму ( $p < 0,01$ ), као и хипокампусу и малом мозгу ( $p < 0,05$ ). Након примене *iTBS* протокола, садржај *SH* група се повећава, односно враћа на контролни ниво у свим можданим структурама. Примена *iTBS* на контролним животињама нема утицаја на концентрацију *SH* група. Плацебо терапија (*CT3*+плацебо) нема значајан утицај на концентрацију *SH* група у односу на *CT3* групу.

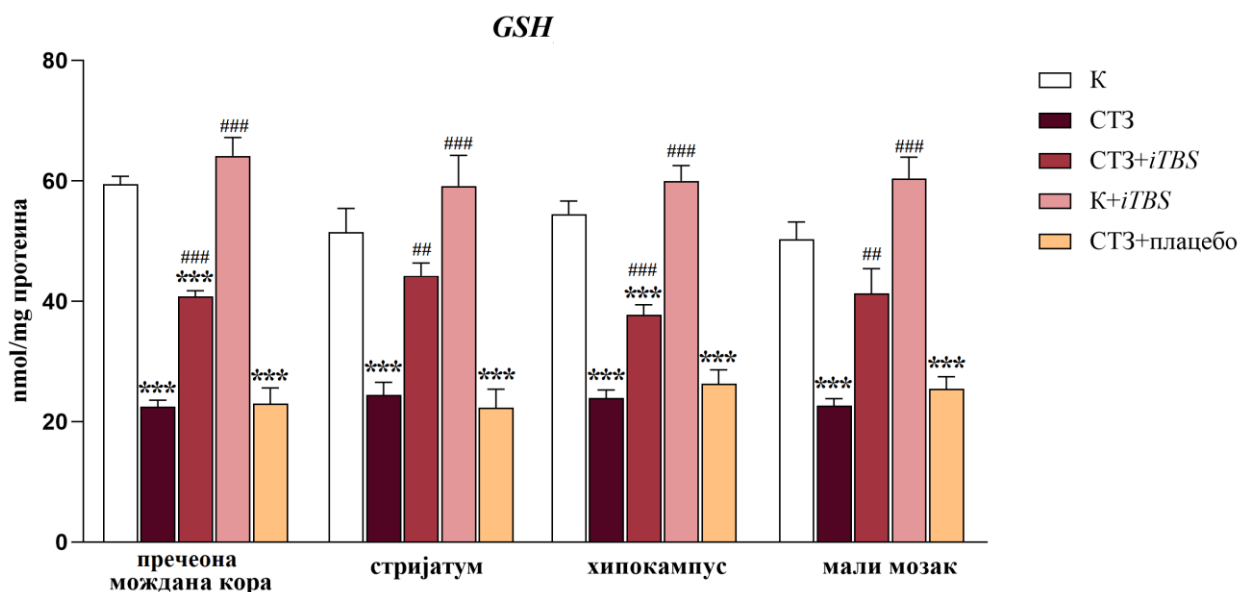


Слика V 18. Утицај *iTBS* на садржај сулфхидрилних (*SH*) група након примене стрептозотоцина (*CT3*) у можданим структурама *Wistar* пацова. Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Символи означавају статистички значајну разлику у односу на контролну (*K*) групу (\*), и групу животиња која је примила *CT3* (#). (\*, #  $p < 0,05$ ; \*\*, ##  $p < 0,01$ ; \*\*\*, ###  $p < 0,001$ ).



### 3.1.8. Ефекат *iTBS* на концентрацију *GSH* након примене *СТЗ* у можданим структурама *Wistar* пацова

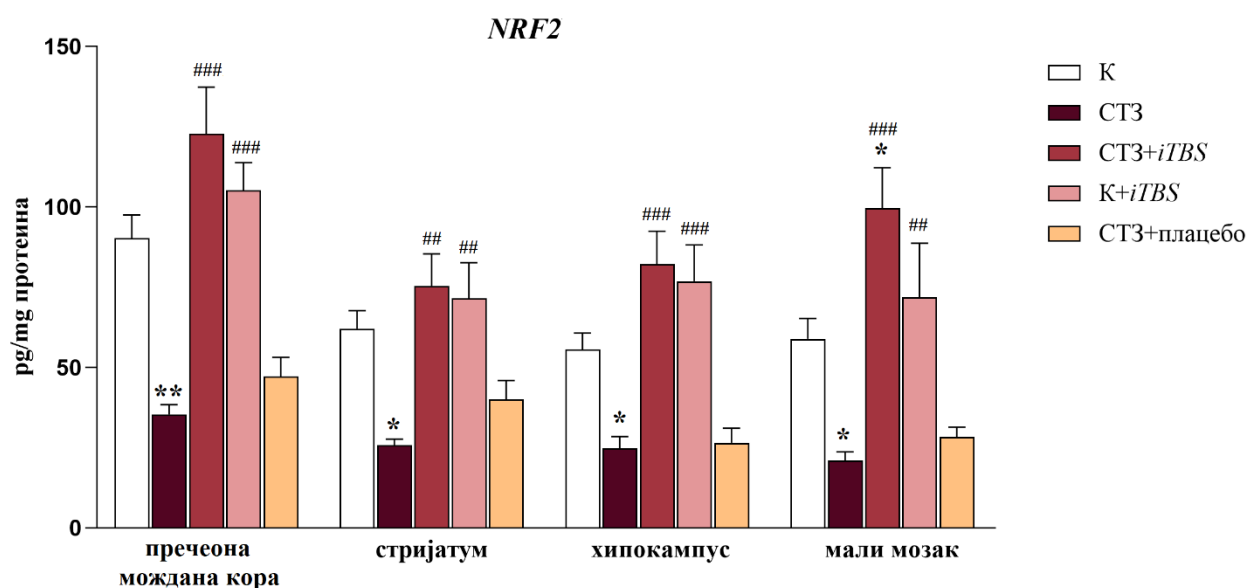
Апликација *СТЗ* доводи до значајног смањења концентрације укупног глутатиона (*GSH*) у свим испитиваним можданим структурама ( $p < 0,001$ ) у односу на контролу. Примена *iTBS* на животињама које су добиле *СТЗ* значајно повећава концентрацију *GSH*, с тим што је у пречеоној можданој кори и хипокампусу концентрација *GSH* значајно нижа у односу на контролу ( $p < 0,001$ ), док се у стријатуму и малом мозгу враћа на контролни ниво. Даље, примена *iTBS* на контролним животињама нема утицаја на концентрацију *GSH* у односу на контролну групу, али значајно повећава садржај *GSH* у односу на *СТЗ* групу ( $p < 0,001$ ) у свим испитиваним можданим структурама. Такође, плацебо терапија (*СТЗ*+плацебо) нема значајан утицај на концентрацију *GSH* у односу на групу која је добила само *СТЗ*.



Слика V 19. Утицај *iTBS* на концентрацију укупног глутатиона (*GSH*) након примене стрептозотоцина (*СТЗ*) у можданим структурама *Wistar* пацова. Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Символи означавају статистички значајну разлику у односу на контролну (*К*) групу (\*), и групу животиња која је примила *СТЗ* (#). (\*, #  $p < 0,05$ ; \*\*, ##  $p < 0,01$ ; \*\*\*, ###  $p < 0,001$ ).

### 3.1.9. Ефекат *iTBS* на ниво *NRF2* након примене *CT3* у можданим структурама *Wistar* пацова

Апликација *CT3* смањује експресију нуклеарног фактора 2 (*NRF2*) у пречеоној можданој кори ( $p < 0,01$ ), као и стријатуму, хипокампусу и малом мозгу ( $p < 0,05$ ) у односу на контролну групу животиња. Након примене *iTBS* протокола, нивои *NRF2* се враћају на контролне вредности у пречеоној можданој кори, стријатуму и хипокампусу, док се у малом мозгу бележи значајно виши ниво *NRF2* активности ( $p < 0,05$ ) у односу на контролу. Плацебо терапија (*CT3*+плацебо) нема значајан утицај на концентрацију *NRF2* у односу на групу која је само третирана *CT3*-ом.

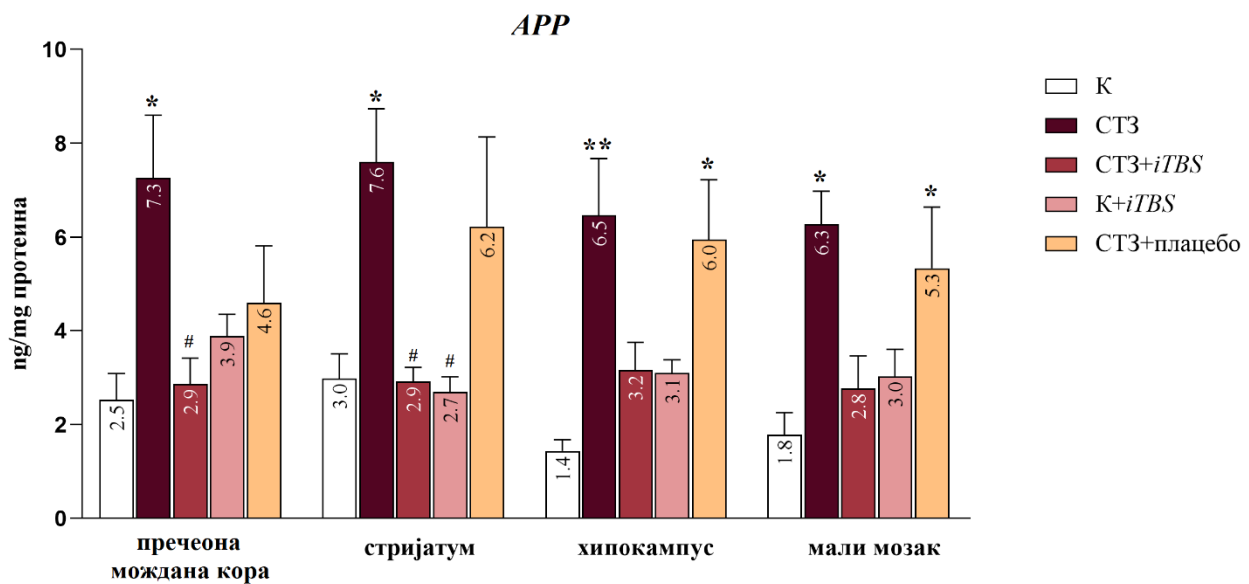


Слика V 20. Утицај *iTBS* на ниво активности нуклеарног фактора 2 (*NRF2*) након примене стрептозотоцина (*CT3*) у можданим структурама *Wistar* пацова. Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Симболи означавају статистички значајну разлику у односу на контролну (*K*) групу (\*), и групу животиња која је примила *CT3* (#). (\*, #  $p < 0,05$ ; \*\*, ##  $p < 0,01$ ; \*\*\*, ###  $p < 0,001$ ).

### 3.2. Испитивање амилоидних протеина

#### 3.2.1. Ефекат *iTBS* на концентрацију *APP* након примене *СТЗ* у мозданим структурама *Wistar* пацова

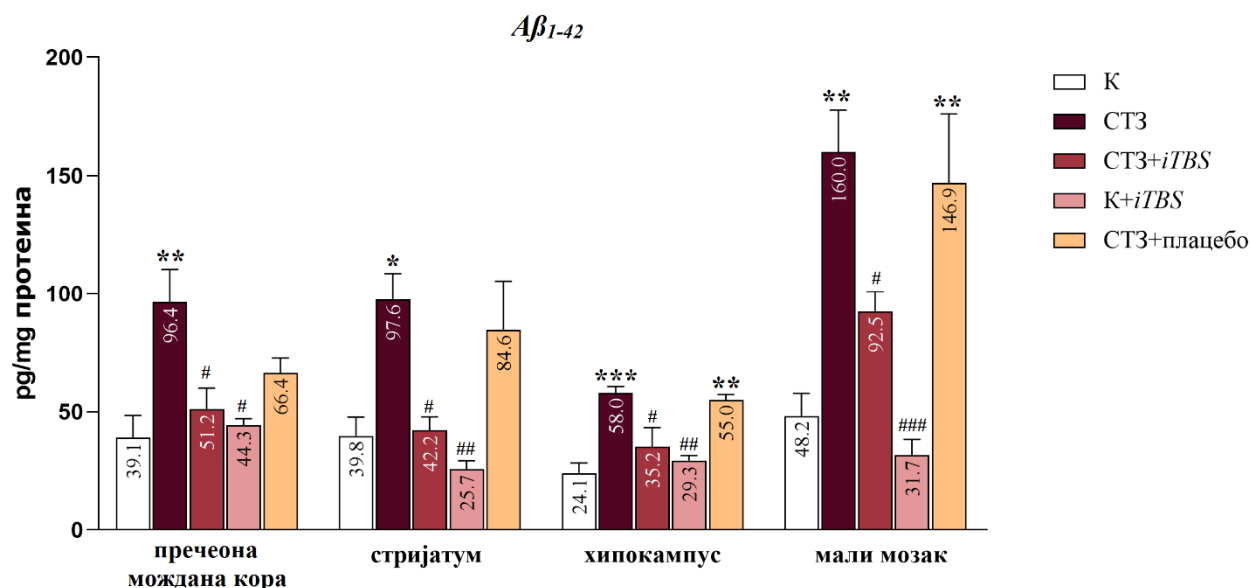
Апликација *СТЗ* повећава концентрацију амилоидног прекурсорског протеина (*APP*) у пречеоној мозданој кори, стријатуму, малом мозгу ( $p < 0,05$ ), као и хипокампусу ( $p < 0,01$ ) у односу на контролну групу. Након примене *iTBS* протокола, концентрација *APP* се смањује у свим структурама, али се статистичка значајност уочава само на нивоу моздане коре и стријатума ( $p < 0,05$ ). Примена *iTBS* на здравим животињама не утиче на концентрацију *APP* у односу на контролне животиње. Такође, плацебо терапија (*СТЗ*+плацебо) нема значајан утицај на концентрацију *APP* у односу на групу која је само третирана *СТЗ*-ом.



Слика V 21. Утицај *iTBS* на концентрацију амилоидног прекурсорског протеина (*APP*) након примене стрептозотоцина (*СТЗ*) у мозданим структурама *Wistar* пацова. Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Симболи означавају статистички значајну разлику у односу на контролну (*К*) групу (\*) и групу животиња која је примила *СТЗ* (#). (\*, #  $p < 0,05$ ; \*\*, ##  $p < 0,01$ ).

### 3.2.2. Ефекат *iTBS* на концентрацију $A\beta_{1-42}$ након примене СТЗ у можданим структурама Wistar пацова

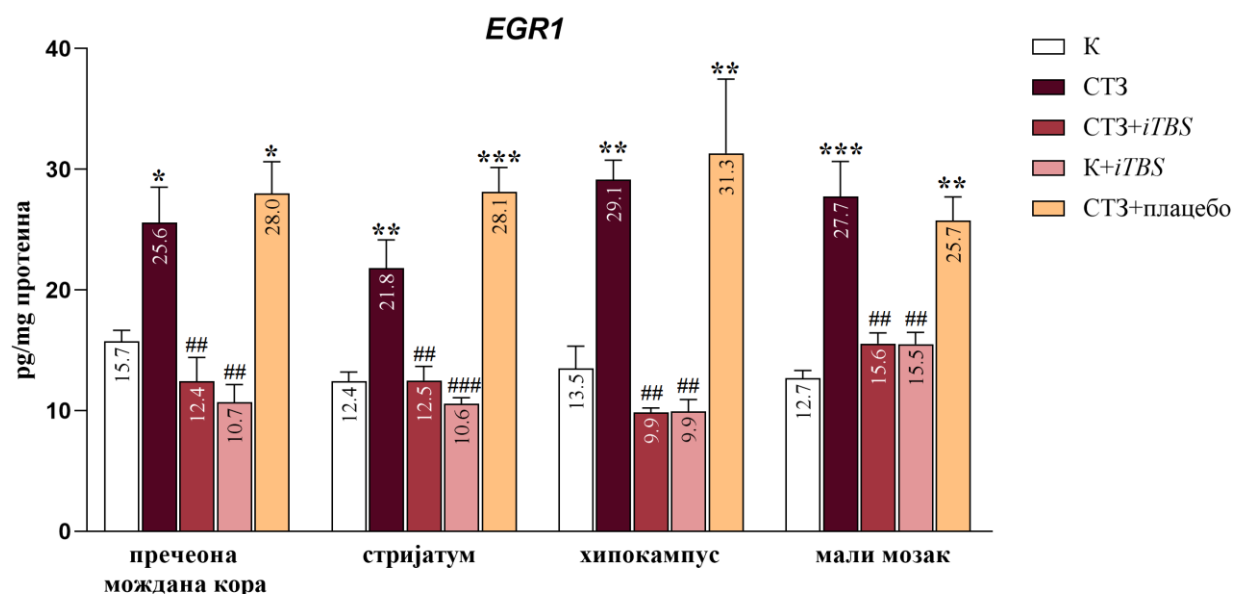
У односу на контролну групу животиња, апликација СТЗ доводи до повећања концентрације  $\beta$  амилоида ( $A\beta_{1-42}$ ) у пречеаној можданој кори ( $p < 0,01$ ), стријатуму ( $p < 0,05$ ), хипокампусу ( $p < 0,001$ ) и малом мозгу ( $p < 0,01$ ), Применом *iTBS* протокола, концентрација  $A\beta_{1-42}$  се значајно смањује у свим структурама ( $p < 0,05$ ) у односу на СТЗ групу. Примена *iTBS* на здравим животињама не утиче на концентрацију  $A\beta_{1-42}$ . Такође, плацебо терапија (СТЗ+плацебо) нема значајан утицај на концентрацију  $A\beta_{1-42}$  у односу на групу која је само третирана СТЗ-ом.



Слика V 22. Утицај *iTBS* на концентрацију  $\beta$  амилоида ( $A\beta_{1-42}$ ) након примене стрептозотоцина (СТЗ) у можданим структурама Wistar пацова. Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Символи означавају статистички значајну разлику у односу на контролну (К) групу (\*) и групу животиња која је примила СТЗ (#). (\*, #  $p < 0,05$ ; \*\*, ##  $p < 0,01$ ; \*\*\*, ###  $p < 0,001$ ).

### 3.2.3. Ефекат *iTBS* на концентрацију *EGR1* након примене СТЗ у мозданим структурама Wistar пацова

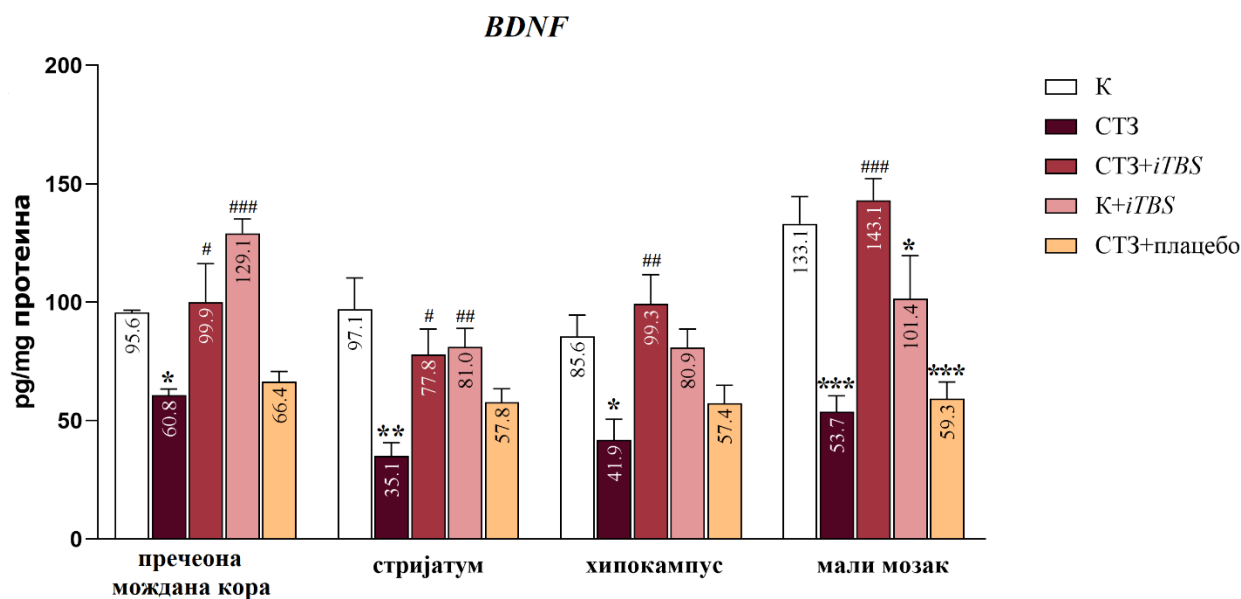
Апликација СТЗ доводи до повећане концентрације *EGR1* у пречеоној мозданој кори ( $p < 0,05$ ), стријатуму ( $p < 0,01$ ), хипокампусу ( $p < 0,01$ ) и малом мозгу ( $p < 0,001$ ), која се након примене *iTBS* значајно смањује у свим испитиваним структурама ( $p < 0,01$ ). Примена *iTBS* на здравим (контролним) животињама нема утицаја на концентрацију *EGR1*. Плацебо терапија (СТЗ+плацебо) такође нема утицаја на концентрацију *EGR1* у односу на групу која је третирана само СТЗ-ом.



Слика V 23. Утицај *iTBS* на концентрацију протеина одговора на рани фактор раста 1 (*EGR1*) након примене стрептозотоцина (СТЗ) у мозданим структурама Wistar пацова. Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Симболи означавају статистички значајну разлику у односу на контролну (К) групу (\*) и групу животиња која је примила СТЗ (#). (\*, #  $p < 0,05$ ; \*\*, ##  $p < 0,01$ ; \*\*\*, ###  $p < 0,001$ ).

### 3.3. Ефекат *iTBS* на експресију *BDNF* након примене *СТЗ* у можданим структурама *Wistar* пацова

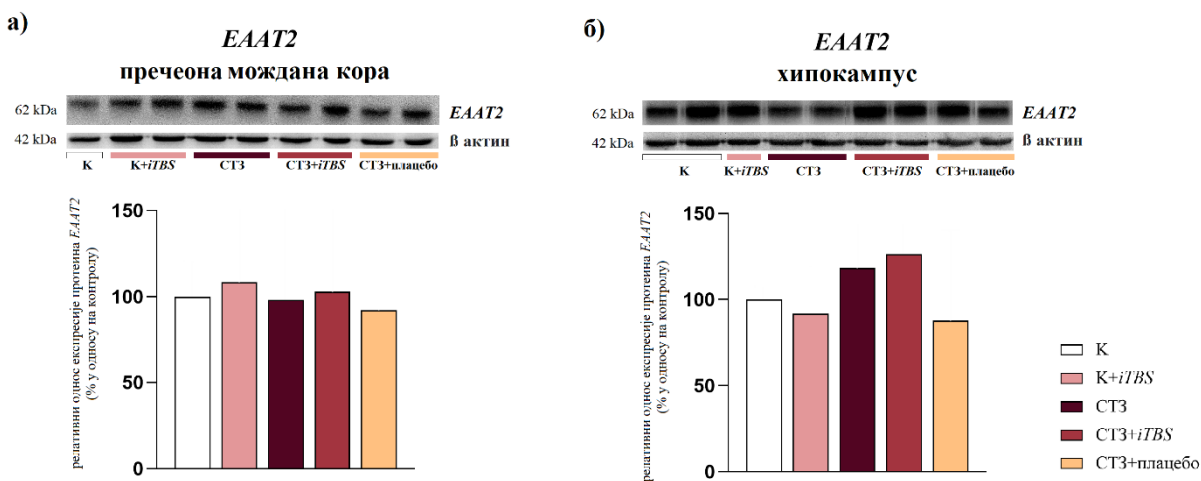
Апликација *СТЗ* доводи до смањења експресије *BDNF* у пречеаној можданој кори ( $p < 0,05$ ), стријатуму ( $p < 0,01$ ), хипокампусу ( $p < 0,05$ ) и малом мозгу ( $p < 0,0001$ ) која се након примене *iTBS* значајно повећава у свим наведеним структурама. Примена *iTBS* на здравим животињама не утиче на ниво експресије *BDNF*. Такође, плацебо терапија (*СТЗ*+плацебо) нема значајан утицај на ниво експресије *BDNF* у односу на групу која је само третирана *СТЗ*-ом.



Слика V 24. Утицај *iTBS* на експресију неуротрофичног фактора можданог порекла (*BDNF*) након примене стрептозотоцина (*СТЗ*) у можданим структурама *Wistar* пацова. Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Симболи означавају статистички значајну разлику у односу на контролну (*К*) групу (\*) и групу животиња која је примила *СТЗ* (#). (\*, #  $p < 0,05$ ; \*\*, ##  $p < 0,01$ ; \*\*\*, ###  $p < 0,001$ ).

### 3.4. Ефекат *iTBS* на експресију *EAAT2* након примене *CT3* у можданим структурама *Wistar* пацова

Апликација *CT3* не доводи до статистички значајних промена у експресији *EAAT2* у пречеоној можданој кори и хипокампусу. Примена *iTBS* на здравим, као и на животињама третираним *CT3*-ом не утиче на експресију *EAAT2*. Такође, плацебо терапија (*CT3*+плацебо) нема значајан утицај на ниво *EAAT2* у односу на групу која је само третирана *CT3*-ом.



Слика V 25. Утицај *iTBS* на експресију транспортера ексцитаторних аминокиселина 2 (енг. *Excitatory Amino Acid Transporter*; *EAAT2*) након примене стрептозотоцина (*CT3*) у а) пречеоној можданој кори и б) хипокампусу *Wistar* пацова. Вредности на графику су представљене као средња вредност релативног односа експресије *EAAT2* изражена у % у односу на контролу.

## VI ДИСКУСИЈА

Транскранијална магнетна стимулација је од великог интереса за истраживања у неуронаукама. Могла би бити потенцијално терапијско средство за модулацију неуронске функције, побољшање неуронске активности, ексцитабилности, пластичности и функционални опоравак код неуродегенеративних болести. И поред заступљености ТМС у клиничкој пракси и релативно добро описаних основних принципа, непознат је тачан механизам којим ТМС регулише биолошке процесе.

Иако ТМС студије на анималним моделима имају посебна ограничења, важне су за стицање увида у механизме деловања ТМС на мозак, што је неопходан услов за потпуно разумевање ефеката неинвазивне стимулације мозга, оптимизацију безбедносних параметара и побољшање клиничке ефикасности. Једно од ограничења је однос величине калема и главе животиње због чега изостаје селективна стимулација, па се не може се утицати на специфичне регионе. Са друге стране, стимулација читавог мозга олакшава проучавање структура које су предубоке да би се безбедно стимулисале код људи.

Такође, постоји велики изазов у екстраполацији добијених налаза на људе. Показана је смањена ефикасност магнетне стимулације у мозгу малих глодара, па су одрживост и ефикасност студија на глодарима још увек неизвесни (175). Није довољно испитана ни усклађеност образаца стимулације која се примењује на глодарима са обрасцима који се користе у клиничким условима. Ипак, анимални модели, значајно доприносе проучавању нових терапијских интервенција и параметара стимулације који тек треба да се ипитају и пруже релевантан систем за истраживање ефеката ТМС на молекулском и ћелијском нивоу.

Ефекат *iTBS* је испитиван како би се прецизније стекао увид механизме дејства овог протокола на моделу СТЗ индуковане сАБ. Избор експерименталног модела сАБ је извршен на основу података из литературе и у складу са циљевима истраживања. Испитивања су вршена истовремено на нивоу понашања, ћелијских и молекулских промена како би се пронашла веза између уочених промена на више нивоа. Избор можданих региона за анализу је извршен на основу физиолошке функције конкретних структура, као и њихове улоге у патогенези болести.

### VI 1. ПРОМЕНЕ У ПОНАШАЊУ

У циљу процене просторног учења и памћења, спроведени су тестови понашања који се заснивају на истраживачкој способности пацова. Узевши у обзир да је апликација СТЗ, односно физиолошког раствора, вршена стереотаксичком хируршком процедуром и да је убод игле потенцијално могао оштетити моторну кору мозга пацова и последично нарушити моторичку способност, предуслов за извођење тестова понашања била је очувана моторичка способност. Тест ротирајућег цилиндра је урађен како би се отклонила могућност нарушене моторичке функције код пацова након хируршког захвата. Контролне и СТЗ-ом третиране животиње су показале врло слично време до пада проведено на ротирајућем цилиндру и укупно време на цилиндру у току теста, сугеришући очувану моторичку координацију, што је физички предуслов за неометано кретање у зракастом лавиринту. Добијени резултати студије потврђују да СТЗ није нарушио моторичку функцију експерименталних животиња



30 дана након апликације (Слика V 1.). Такође, искључена је сумња на повреде моторне коре и субкортикалних структура током стереотаксичке хируршке процедуре што је у складу са постојећом литературом (176 - 179).

Апликацијом СТЗ у коморе настаје експериментални модел сАБ који опонаша неке од карактеристика болести, посебно оних које се односе на слабљење функција повезаних са просторном оријентацијом, учењем и памћењем. Бројне студије су показале да ицв примена СТЗ изазива оштећење различитих облика памћења и учења (50, 63, 67, 180) што га чини погодним моделом за испитивање различитих неуропротективних стратегија. Радна меморија се као врста активног краткорочног памћења објашњава као скуп процеса који омогућавају чување и коришћење привремених података, односно извршавање сложених когнитивних активности (181). Дорзолатерални део пречеоне коре мозга који је задужен за радну меморију (182) у тесту зракастог лавиринта одражава памћење позиције кракова који су већ посећени, док се грешка описује поновним уласком у крак из ког је већ конзумирана храна. Са друге стране, референтна меморија је облик дугорочног памћења који се односи на памћење позиције кракова у којима се налази храна и чија грешка показује улазак у крак који никада није садржао мамац. Код пацова третираних СТЗ-ом уочава се повећан број грешака референтне и радне меморије, дуже време потребно за завршетак теста и мањи меморијски учинак у поређењу са резултатима истих животиња тестираних пре операције. Добијени резултати показују да СТЗ индукује дефиците у референтној и радној меморији 30 дана након примене, чиме се потврђује валидност модела АБ из перспективе оштећења функција учења и памћења Слика V 2.).

Недавна истраживања су показала да број грешака радне и референтне меморије, као и времена потребног да се изврши задатак у зракастом лавиринту расте зависно од времена, а почевши већ од деветог дана након ицв апликације СТЗ (161). Други аутори такође наводе да животиње третиране СТЗ-ом показују много спорији процес учења и задржавања меморије (67), као и смањен капацитет за извршавање задатака у вези са просторним учењем и памћењем, што су све функције зависне од хипокампуса (63). Ови подаци доприносе релевантности животињских модела АБ, узевши у обзир да су оштећење просторне меморије и дезоријентација примарни знакови прогресивног когнитивног опадања ученог код пацијената са АБ.

Испитивање утицаја *iTBS* протокола на функције учења и памћења је вршено праћењем промена понашања експерименталних група у зракастом лавиринту у две временске тачке: пре и након *iTBS* стимулације, у временском размаку од 15 дана између два тестирања. У погледу времена потребног за извршење задатака и меморијског учинка, статистичка разлика се уочава само код животиња третираних СТЗ-ом након десет *iTBS* сесија што сугерише позитиван ефекат *iTBS* третмана на когнитивно оштећење изазвано апликацијом СТЗ (Слика V 3.). Уочавају се благе промене и код здравих животиња након *iTBS* третмана, али изостаје статистичка значајност. Резултати других лабораторија показују да примена рТМС на здраве пацове у трајању од четири седмице изазива позитивне ефекте на епизодно просторно учење и памћење што је потврђено у тестовима Морисовог воденог лавиринта (183). Ова неслагања вероватно потичу од разлике у примени врсте рТМС протокола, дужини примене протокола, као и од временског оквира у којем се промена посматра. У поменутиим временским терминима праћене су контролна и СТЗ група без стимулације, као и плацебо група и нису уочене значајне промене. Изостанак статистичке значајности у терминима са малим временским размаком код здравих животиња је очекиван,

узевиши у обзир да се за 15 дана не очекује драстично побољшање функција учења и памћења код здравих животиња. Такође, оправдан је изостанак статистичке значајности праћењем посебно група СТЗ и СТЗ+плацебо што указује да за 15 дана није дошло до прогресивног смањења или пак спонтаног опоравка праћених функција под утицајем токсина.

Бројне студије се баве испитивањем утицаја ТМС на патолошке промене у АБ (137, 184). Једна клиничка студија је упоређивала високо- и нискофреквентни рТМС третман код пацијената са АБ и показала боље резултате са високофреквентном стимулацијом (185). Потврђено је да примена *iTBS* умањује когнитивна оштећења код пацијената оболелих од АБ (186). Неразјашњен механизам настанка и патолошке прогресије АБ, као и ограничена истраживања на људима отежавају разумевање прецизног механизма позитивног ефекта *iTBS* који би допринео оптимизацији протокола, начину примене и последично ефикаснијем лечењу. У међувремену, студије на анималним моделима уз обазриво тумачење и екстраполацију добијених резултата могу допринети проширењу постојећег знања.

Бројне студије су показале да примена рТМС на различитим анималним моделима АБ доринноси слабење функција учења и памћења (128, 187 - 189). Такође, показано је да примена *iTBS* протокола на моделима других неуродегенеративних болести ублажава оштећење памћења (190), док нема података о утицају *iTBS* протокола на памћење и учење у СТЗ индукованом моделу АБ. Један од предложених механизма којим се објашњава ефекат на учење и памћење је да рТМС побољшава метаболизам на нивоу крвно-мождане баријере чиме се повећава ефикасност уклањања патолошких накупина у моделу АБ (171, 189). Затим, један од широко прихваћених механизма дејства рТМС је ублажавање оштећења учења и памћења активацијом *BDNF* који путем модулације *LTP* регулише синаптичку пластичност (183, 191).

## VI 2. МОРФОЛОШКЕ ПРОМЕНЕ

Измене у понашању су праћене хистоморфолошким променама у специфичним регионима мозга, које су у складу са познатим променама у СТЗ индукованом моделу АБ (51). Посебна осетљивост хипокампуса у моделу сАБ може бити резултат велике густине инсулинских рецептора (192) који су мете СТЗ токсичности (64). Регион СА3 је привукао велику пажњу последњих година због своје подложности неуродегенерацији и специфичне улоге у процесима памћења (193), посебно у епизодном памћењу (194) и просторној меморији (195). Ретке некротичне ћелије и реактивна глиоза уочене у СА3 региону вентралног хипокампуса, могу бити последица измењеног метаболизма глукозе или анатомске близине СА3 региона са бочним коморама у које је убризган СТЗ (63). Такође, новији радови показују да се код мишева уочавају дегенеративне промене на неуронима у пречеаној можданој кори и хипокампусу 25 дана након ицв СТЗ (196).

Морфолошке промене у нашој студији уочене у медијалној хабенули и перивентрикуларној области каудопутамена највероватније су последица директног дејства СТЗ, јер су анатомски близу места убризгавања токсина (Слика V 6.). Потврђено је да медијална хабенула, између осталог, регулише и активности холинергичких неурона можданог стабла и њихову активност у структурама укљученим у когнитивне процесе, посебно у учењу заснованом на награди (197). Лезије хабенула доводе до когнитивних и моторних дисфункција, промена понашања, неадекватног доношења одлука заснованих на

награди што може бити значајно за настанак различитих неуролошких и менталних поремећаја и претпоставља се да може бити мета нових терапијских метода лечења неуролошких и психијатријских обољења (197).

Благо увећање бочних комора, уочено у овој студији, је истакнута карактеристика АБ, али је потврђено и на анималном моделу АБ након ицв апликације СТЗ (62, 69).

Заједно, добијени резултати сугеришу да СТЗ изазива благе промене на нивоу неурона у вентралном хипокампусу, медијалној хабенули и перивентрикуларној области. Уочене промене попут неуродегенерације и последичне синаптичке дисфункције у регионима мозга повезаним са памћењем и мотивисаним понашањем су сличне патологији сАБ што додатно потврђује релевантност овог животињског модела.

Реактивна глиоза се јавља у раном стадијуму болести и манифестује се пролиферацијом и променом морфологије астроцита и микроглије (156). Међутим, и даље је предмет дебате да ли је инфламацијски одговор посредован глија ћелијама уочен у АБ последица или узрок неуродегенерације (18). Истраживања показују да реактивна глиоза и пратећа неуроинфламација имају важну улогу у процесу иницијације и прогресије АБ (198). Иако није познато у којој мери реактивна глиоза одражава неуропротективне или неуродегенеративне карактеристике АБ (199), има доказа о позитивним ефектима рТМС на глија ћелије (147).

Почетну фазу неуродегенерације прати активација микроглије, и то вероватно са аспекта иницијалне заштите (200). Дакле, као одговор на промене у окружењу, микроглија се активира и пролази кроз функционалне и структурне трансформације, што је забележено и у одговору мозга на промене изазване АБ (198, 201). Апликација СТЗ доводи до активације микроглије из антиинфламаторног *M2* у проинфламаторни *M1* фенотип и последичног повећања проинфламаторних медијатора у хипокампусу пацова (202). Реактивна глиоза и повећани проинфламаторни маркери повезани са когнитивним оштећењем уочени су и у СТЗ моделу сАБ (203, 204). *Bassani* и сар. су забележили да се пик микроглијалне активације 7 дана након ицв апликације СТЗ у зупчастој вијуги, *CA1*, *CA3* и перивентрикуларном региону (63, 205) одржава само у перивентрикуларним подручјима након 30 дана (63). Уочена трансформација *Iba1+* ћелија у перивентрикуларној области дорзалног хипокампуса, пречеаној можданој кори и медијалној хабенули 54 дана након апликације СТЗ доводи до претпоставке да се пик микроглијалне активације десио раније током експеримента и да добијени резултати одражавају термин када је реактивна микроглија вероватно у фази трансформације ка фази мировања (Слика V 8.). Важно је напоменути да морфологија микроглије варира у зависности од просторне позиције и стадијума болести (17). На пример, микроглија у близини амилоидних плакова пролази кроз изразите морфолошке и електрофизиолошке промене, док микроглија удаљена од плакова показује само мање промене током времена (12). Штавише, реактивна микроглиоза се уочава и пре појаве плакова у анималним моделима АБ (16), што сугерише да је неуроинфламација рани догађај у АБ. Шалковић-Петришић и *Hoyer* указују да се код СТЗ модела АБ амилоидни плакови могу уочити тек три месеца након ицв апликације СТЗ (64), па се блага микроглиоза уочена након 54 дана може објаснити и одсуством плакова.

Применом десет сесија *iTBS*, морфологија *Iba1+* ћелија третираних СТЗ-ом одговара облику ових ћелија у мировању. Познато је да микроглија ослобађа *BDNF* који доприноси

*LTP* чиме се објашњава укљученост микроглије у синаптичку пластичност (206). Смањење реактивности микроглије под утицајем *iTBS* добијено на нашем моделу, може представљати резултат регенерације когнитивног оштећења (147, 207). Смањена активација микроглије се уочава и код повреде кичмене мождине након примене високофреквентне рТМС (158), али и након примене *iTBS*, на другим моделима неуродегенерације као што је експериментални аутоимунски енцефалитис - ЕАЕ (208, 209). Међутим, није јасно да ли *iTBS* директно утиче на реактивност микроглије или је добијена промена резултат секундарних ефеката. Наши резултати су у сагласности са резултатима других аутора да је контрола реактивности микроглије важан чинилац приликом разматрања терапијског приступа АБ и другим неуродегенеративним болестима (17, 198). Како микроглија утиче на активност неурона и реагује на сигнале који су измењени неуронском активношћу (206), њихова улога као ћелијских медијатора ТМС-а са правом привлачи велику пажњу истраживача.

Астроцити учествују у контроли неуронских кола укључених у емоције, учење и памћење, док је дисфункција астроцита део патологије бројних неуродегенеративних болести, укључујући и АБ. Код пацијената са АБ, као и у анималним моделима, највидљивије промене се очекују у хипокампусу и из тог разлога је овај регион изабран за процену реактивности астроцита. Хипокампус подржава памћење чињеница и догађаја, заједнички познатих као декларативно памћење и често се проучава у контексту просторног памћења код глодара (210). Физиолошка улога астроцита је да одржава хомеостазу нервног ткива, али у одређеним патолошким стањима астроцити постају један од главних извора штетних слободних радикала чиме директно промовишу неуронска оштећења (33). Примена СТЗ доводи до повећане имунореактивности *GFAP+* ћелија у зони каудопутамена и хипокампуса, а посебно у *CA1* и фимбрији које се налазе у близини бочних комора где је апликован СТЗ, што указује да је реактивна астроглиоза присутна и осам седмица након примене СТЗ (Слика V 10.). Бројни радови су у сагласности са добијеним резултатима да примена СТЗ утиче на промену броја и морфологије астроцита у хипокампусу пацова (63, 176, 204, 211) Повећана активност астроцита детектована кроз имуноцитохемијско бојење и колокализацију *GFAP+/VIM+* у хипокампусним и перивентрикуларним подручјима вероватно одражава активна места синаптичке дисфункције и неуродегенерације (212). У контексту добијених резултата *Ibal+* бојења, ослабљене функције учења и памћења уочене на тестовима понашања би могле представљати последицу поремећене инервације и директног оштећења у овим регионима.

У бројним радовима у којима је испитиван ефекат различитих облика ТМС на активност астроцита, сугерисано је да астроцити могу бити посредници промена у мозгу индукованих ТМС-ом (147). Ефекат стимулације на астроците зависи од више фактора као што су облик, начин примене и дужина стимулације, као и почетни стадијум (ре)активације астроцита, па се интерпретација резултата мора вршити веома обазриво. Након примене 10 сесија *iTBS*, у хипокампусу се уочава смањен број *GFAP+/ VIM+*, односно смањена активност астроцита претходно изазавана ицв СТЗ-ом (Слика V 10.). Ово је снажан доказ да *iTBS* смањује реактивну астроглиозу у *CA1* региону и фимбрији спречавајући штетне ефекте реактивне глиозе. Даље, ово може објаснити побољшање когнитивних функција зависних од хипокампуса након стимулације. Астроцити могу директно или индиректно реаговати на електричну активност и у складу са досадашњим доказима представљају ћелијске ефекторе *iTBS* (188, 208, 209) што даје образложење за уочене промене и на хистолошком и на функционалном нивоу.

Како глија ћелије имају кључну улогу у опоравку мозга, на основу изнесених података, могу бити обећавајућа терапијска мета за АБ и сродне неуродегенерације, те је од велике важности детаљно откривање молекуларних механизма изазваних ТМС-ом.

### VI 3. БИОХЕМИЈСКЕ ПРОМЕНЕ

Након ицв примене, СТЗ генерише централну инсулинску резистенцију што доводи до хипометаболизма глукозе, оштећења митохондрија и стварања унутарћелијског оксидативног стреса (213). Бројне студије показују да СТЗ подстиче оксидативни/ нитрозативни стрес у мозгу пацова већ седмог дана након примене и да је присутан чак осам недеља након акутне примене, што указује на дуготрајни дегенеративни процес (57, 59, 60, 214 - 217 ). Неке студије су показале да ицв примена СТЗ мења оксидативну/ нитрозативну равнотежу у неким регионима мозга, укључујући хипокампус и мождану кору (216, 217).

Повећана концентрација  $O_2^{\bullet}$  детектована у свим испитиваним структурама спроведеног истраживања осам недеља након примене СТЗ указује на хронични редокс дисбаланс (Слика V 12.). Висока потреба можданог ткива за кисеоником под утицајем СТЗ-а чија хемијска природа нарушава метаболизам глукозе у ЦНС-у, доводи до метаболичке и енергетске неравнотеже која резултује високом производњом РВК. Како се повећана концентрација  $O_2^{\bullet}$  региструје у свим испитиваним структурама, не може се говорити о директном утицају токсина због начина апликације, већ се производња супероксида може приписати индиректном ефекту. Такође, повећаној производњи оксидативних врста може допринети и претходно описана реактивна глиоза под утицајем СТЗ-а. Реактивна микроглија детектована код пацијената са АБ, као и на моделу са СТЗ, индукује стварање велике количине РВК и РВА у ЦНС-у. У ситуацији где већ постоји повећана производња оксиданаса у односу на ослабљену антиоксидативну одбрану узроковану старењем (218), ово представља један од највећих фактора ризика за настанак АБ.

Примена *iTBS* на здравим животињама није довела до промена у погледу концентрације  $O_2^{\bullet}$  што може значити потпуну безбедност примене протокола на здравим животињама. Са друге стране, примена *iTBS* на животињама третираним претходно са СТЗ показала је значајну редукацију  $O_2^{\bullet}$  у свим испитиваним можданим структурама што потврђује протективне ефекте стимулације уз смањење оксидативног стреса и спречавање његовог штетног утицаја.

У плацебо групи регистроване су сличне промене стварања  $O_2^{\bullet}$  као код примене токсина што говори у прилог томе да резултати заиста осликавају утицај СТЗ-а, односно *iTBS* на анималном моделу сАБ и да руковање животињама за време примене стимулације, као ни звучни стимулуси апарата, немају утицаја на добијене резултате.

Важна компонента патогенезе и прогресије АБ, поред оксидативног стреса је и развој нитрозативног стреса у мозгу (219). Митохондрије су главни ендогени извор РВК и РВА које доприносе развоју оксидативног/ нитрозативног стреса, али су и саме мета процеса посредованих слободним радикалима (220). У физиолошким условима РВА су важне компоненте ћелијске сигнализације, док повећане концентрације доприносе развоју

нитрозативног стреса и оштећењу биолошких молекула (221). Повећане концентрације нитрата и нитрита у свим испитиваним можданим структурама, детектоване осам недеља након примене СТЗ-а, као и у плацебо групи животиња, говоре у прилог томе да СТЗ доприноси развоју нитрозативног стреса (Слика V 13.). У складу са добијеним резултатима су и скорашњи радови других аутора да је повећан ниво нитрита детектован у можданој кори и хипокампусу 22 дана након ицв апликације СТЗ (217). Претпостављено је да су РВА и РВК повећане због хипометаболизма глукозе коју изазива хемијска природа СТЗ (121). Редукција нитрата и нитрита може бити биолошки извор •NO-а, главног представника РВА. Услед неконтролисане производње •NO-а, нарушене су његове физиолошке улоге попут учешћа у интернеуронској комуникацији, синаптичкој пластичности, интраћелијској сигнализацији и ослобађању неуротрансмитера, што може допринети когнитивној дисфункцији у СТЗ моделу сАБ (221).

Није забележен утицај *iTBS* на ниво нитрата и нитрита код здравих животиња, што се може тумачити као безбедна примена терапије на здравим јединкама. Смањење нитрата и нитрита у свим испитиваним структурама након примене *iTBS* на животињама третираним СТЗ-ом је релативно чврст доказ да десет сесија *iTBS* утиче на смањење нитрозативног стреса у СТЗ моделу сАБ. На моделу *EAE* показано је да примена *iTBS* протокола узрокује смањење концентрације *NADPH*, једног од важних кофактора настанка •NO у ћелијама (222), што делом може објаснити утицај *iTBS* на смањено стварање нитрата и нитрита у моделу сАБ.

Различите врсте РВК и РВА доводе до оксидативног оштећења биолошких молекула, па тако повећана производња слободних радикала доводи до оксидативног оштећења липида биолошких мембрана (223). Пероксидацијом липида ћелијских мембрана индукују се промене интегритета и структуре мембране, што затим доводи до промене њене пропустљивости. Тако измењени липиди могу даље да формирају токсичне производе који оштећују протеине и нуклеинске киселине (224). Поремећени метаболизам липида, посебно липидна пероксидација, игра важну улогу у настанку многих неуродегенеративних болести, укључујући АБ (225). Процес липидне пероксидације се одвија кроз фазу иницијације, пропагације и терминације, а као крајњи производ каскаде реакција настаје *MDA* чија промена концентрације може пружити увид у процену степена оксидативног оштећења ћелијских мембрана (223). Повећане концентрације *MDA* су детектоване у можданој кори и хипокампусу *Wistar* пацова, али и других експерименталних животиња 3 и 4 седмице након ицв примене СТЗ (196, 217, 226, 227). Повећана концентрација *TBARS*, у којима се садржи и *MDA*, регистрована је у свим испитиваним структурама осам недеља након апликације СТЗ што указује на постојећу оксидативну модификацију биомолекула (Слика V 14.). Даље, у СТЗ групи која је изложена плацебо ефекту уочавају се идентичне промене, чиме се потврђује да плацебо *iTBS* не утиче на резултате студије. Изузетак је хипокампус где изостаје статистичка значајност, али се свакако уочава повећање концентрације *TBARS* у групи СТЗ+плацебо у поређењу са контролном групом. Повећана производња слободних радикала, заједно са оксидативном модификацијом липида указује на оштећење мембране митохондрија доприносећи и митохондријској хипотези развоја АБ (228) и валидацији СТЗ модела.

Примена *iTBS* на здравим животињама није довела до промена у погледу концентрације *TBARS* у свим испитиваним можданим регионима што је у сагласности са претходним истраживањима (103). Ови резултати добијени на адултима *Wistar* пацова након вишестратне стимулације по *iTBS* протоколу могу се објаснити очуваношћу липидних мембрана у односу на потенцијално деловање реактивних врста. Очекивано је да смањење оксидативног и нитрозативног стреса, потврђено смањеним стварањем  $O_2^{\bullet}$  и редукованом концентрацијом нитрита и нитрата након примене десет сесија *iTBS* у свим испитиваним структурама доведе и до смањења пероксидације липида. И заиста, смањени нивои *TBARS* се детектују у свим испитиваним структурама након стимулације осим у хипокампусу где изостаје статистичка значајност. Добијени резултати показују да стимулација смањује физиолошку одбрану липидних мембрана од оксидативног оштећења у региону хипокампуса што може бити знак веома очуваног, чак унапређеног редокс стања у овом региону у односу на друге мождане структуре (229). Могуће је да су високе вредности *TBARS* након давања СТЗ резултат веће подложности ткива хипокампуса процесима пероксидације. Заправо, селективност која се јавља у оштећењу, може се објаснити специфичном биохемијском организацијом појединих региона, што значи да ће структуре (као што је хипокампус) богатије садржајем медијатора ћелијске смрти лакше подлећи оштећењу (230). Истраживања *post mortem* су показала да је регион хипокампуса оболелих од АБ посебно захваћен оштећењем липидних мембрана где је регистровано повећање нивоа акролеина који представља производ липидне пероксидације, чак 100 пута реактивнији од 4 хидроксинонела (*4-HNE*), а који доводи до повећања интрацелуларне концентрације  $Ca^{2+}$  и познате серије догађаја на глутаматергичкој синапси које ћелију воде у смрт (231). Такође, производња  $ONOO^-$  у реакцији  $O_2^{\bullet}$  и  $NO$  (имајући у виду дистрибуцију ензима *NOS* у мозгу), као и богатство садржајем  $Fe$  у хипокампусу објашњавају пропацију липидне пероксидације у овој можданој структури поред протективне примене *iTBS* протокола.

Митохондријска дисфункција и запаљенски процеси су повезани са оксидацијом не само липида, већ и нуклеинских киселина и протеина. Једарни и митохондријски нивои *8-OHdG*, биомаркера оксидативног оштећења нуклеинских киселина, су повишени код пацијената са АБ и у експерименталним моделима АБ (232). Показано је да оксидативни стрес изазван СТЗ-ом може директно да проузрокује промене у обрасцу метилације ДНК, што доводи до поремећене транскрипције и/или мутације гена и покретања каскаде неуродегенеративних догађаја праћених повећаним нивоом *8-OHdG* (213).

У студији су измерени повећани нивои *8-OHdG* у свим испитиваним структурама осам седмица након ицв примене СТЗ (Слика V 15.). Како је *8-OHdG* маркер ћелијског оштећења и смрти, детектоване вредности могу бити у корелацији са дегенеративним поремећајима у нервном ткиву. Након десет сесија *iTBS* протокола код животиња које су примиле ицв СТЗ, уочава се вишеструко смањење нивоа *8-OHdG*, што заједно са другим подацима може указивати на побољшану заштиту и/ или побољшан опоравак нервних ћелија. Међутим, смањени нивои *8-OHdG* не указују искључиво да *iTBS* ублажава оштећење ДНК, јер постоји нормалан обрт деградације нуклеинских киселина у свакој ћелији и ниво *8-OHdG* нужно не указује на оштећење или смрт. Литературни подаци показују да су повећани нивои фрагмената ДНК ланаца на моделу АБ део нормалног процеса апоптозе (47, 68, 160). Међутим, студије сугеришу и да су оксидативна оштећења одговорна за повећан ниво прекида ДНК ланаца (58).

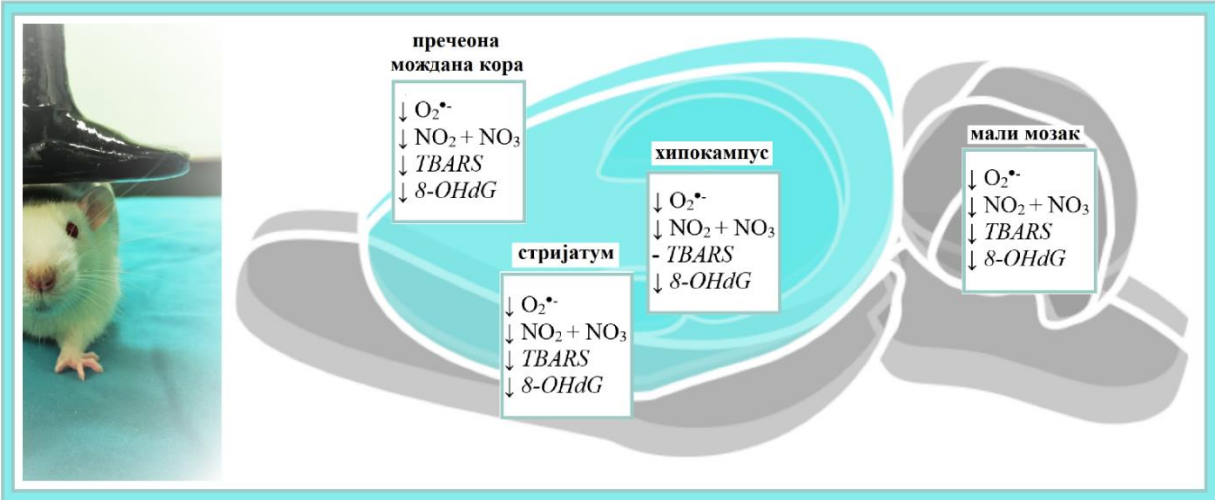


Схема VI 1. Схематизован приказ параметара оксидативног (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) и нитрозативног стреса (NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>) и оксидативног оштећења липида (TBARS) и нуклеинских киселина (8OHdG) у мозданим структурама модела АБ након примене iTBS протокола

Поред великих потреба за кисеоником и последичне производње слободних радикала, изузетној осетљивости мозга доприноси и релативно слаба антиоксидативна заштита. Због тога оксидативни стрес, односно антиоксидативна одбрана представља веома важну терапијску мету за многе неуролошке болести. Досадашњи подаци показују знатно ослабљену антиоксидативну заштиту након ицв примене СТЗ, углавном регистрованоу у мозданој кори и хипокампусу (216, 217, 233, 234), чинећи овај модел прихватљивим за испитивање ефекта iTBS на антиоксидативни потенцијал.

Механизми помоћу којих антиоксиданти штите биолошке системе од оксидативних оштећења укључују директно уклањање РВК/РВА и секвестрацију слободних каталитичких јона метала, који промовишу формирање реактивних врста. У ткивима сисара, један од најзначајнијих антиоксиданата је SOD, која катализује дисмутацију O<sub>2</sub><sup>-</sup> и заједно са CAT пружа заштитне механизме против унутарћелијске акумулације H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Неравнотежа између повишене производње РВК и концентрације антиоксиданата директно је укључена у патогенезу многих болести.

Супероксид дизмутаза (*tSOD*) представљају веома важне компоненте антиоксидативне одбране од оксидативног стреса у мозгу. Ови ензими делују као добар терапијски агенс код болести посредованих реактивним врстама кисеоника (235). Смањена активност *tSOD* се уочава код старења, али и код АБ, као и у животињским моделима АБ изазваним СТЗ-ом (216, 217, 233). Значајно смањена активност *tSOD* у свим испитиваним мозданим структурама након примене СТЗ на експерименталном моделу су у складу са постојећим резултатима (236) и указују на слабљење антиоксидативног капацитета (Слика V 16.). Поред дизмутације O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>, SOD су такође делимично укључене у детоксикацију нитрозативног агенса пероксинитрита (ONOO<sup>-</sup>), који настаје реакцијом између NO<sup>•</sup> и O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>. Такође, SOD спречава штетан догађај брзе реакције ONOO<sup>-</sup> са CO<sub>2</sub>, при чему би настали реактивнији слободни радикали (237). Снижена активност SOD након примене СТЗ указује на исцрпљен антиоксидативни потенцијал ензима у дизмутацији велике количине створеног



$O_2^{\bullet}$  (Слика V 12.), односно ослобођеног садржаја нитрита и нитрата (Слика V 13.) након апликације токсина.

Након примене *iTBS* код животиња којима је апликован СТЗ, у свим испитиваним можданим структурама уочава се враћање антиоксидативног капацитета на контролни ниво израженог кроз повећање активности *SOD*, док се применом *iTBS* на здравим животињама не уочава промена. Једно од објашњења може бити да повећано генерисање производа пероксидације липида након давања токсина може бити одговорно за појачану ензимску антиоксидативну активност код животиња претретираних СТЗ-ом за разлику од контролних животиња (238).

Водоник пероксид који настаје као резултат дизмутације  $O_2^{\bullet}$  даље бива неутрализован под дејством *CAT* или *GSH-Px*. Након интоксикације СТЗ-ом, детектовано смањење активности *CAT* у свим испитиваним структурама (Слика V 17.) потврђује утицај СТЗ на смањење антиоксидативног капацитета, што је у складу са публикованим резултатима других аутора (217). Показано је чак и да примена мањих доза СТЗ након четири недеље узрокује смањење *CAT* у мозгу пацова (239). Недостатак или оштећење функције *CAT* се повезује са патогенезом многих дегенеративних болести повезаних са старењем, укључујући и АБ (240). Показано је да  $A\beta$  пептид који је одговоран за акумулацију  $H_2O_2$  у неуронима хипокампуса (241), директним везивањем  $A\beta$  за *CAT* доводи до деактивације њене каталитичке активности (242) и стварања услова оксидативног стреса.

Након примене *iTBS* код животиња претходно ишв третираних са СТЗ уочава се повећање активности *CAT* у пречеоној можданој кори, хипокампусу и малом мозгу што упућује на знатан утицај *iTBS* на повећање антиоксидативног капацитета. Такође, публиковани су радови који показују да рТМС повећава активност *CAT* у примарној култури хипокампусних неурона (243). У стријатуму пак, заштитни потенцијал *iTBS* у контексту активности *CAT* изостаје. Познато је да је *CAT* активнија у присуству већих концентрација  $H_2O_2$ , док мање количине ефикасно неутралише *GSH-Px* (85), тако да једно од објашњења за изостајање ефекта *iTBS* на активност *CAT* може бити недовољна количина супстрата у стријатуму. Такође, објашњење за неизмењену активност ензима након стимулације у овој можданој структури може пружити изостанак протективног и адаптивног механизма у стријатуму као одговор на оксидативни стрес који је чак нижи и од контролних вредности. Познато је да је стријатум структура најбогатија гвожђем, преко кога се може покренути процес липидне пероксидације (244). Такође, веома је висок метаболички обрт допамина, при чему се генерише  $H_2O_2$  и долази до аутооксидације допамина и стварања  $O_2^{\bullet}$  чиме се стичу услови за стварање ОН који покреће липидну пероксидацију (244). У овим измењеним условима покренутих оксидационих механизма, *CAT* нема довољан капацитет за успостављање редокс равнотеже, односно *iTBS* стимулација не успева да превазиђе оштећење.

Још једна важна компонента антиоксидативног капацитета је тиолни антиоксидант *GSH*, који има улогу у антиоксидативној заштити као кофактор антиоксидативних ензима, али учествује и у директном уклањању слободних радикалских врста  $O_2^{\bullet}$ , ОН $\bullet$  и  $ONOO^-$ , као и пероксида и липидних радикала (245). Значајно смањење *GSH* (Слика V 19) у свим испитиваним можданим структурама након апликације СТЗ одражава се на смањен антиоксидативни капацитет, што је у складу са постојећим подацима (196, 217, 226, 246).

Имајући у виду да хемијска структура СТЗ нарушава метаболизам глукозе, последично се јавља смањена производња АТП-а која ограничава синтезу *GSH* (247). Смањење садржаја неензимског антиоксиданса је у складу са претходно добијеним повећаним концентрацијама прооксидативних и пронитрозативних параметара осам недеља након примене СТЗ. Због присуства већег нивоа РВК и РВА, *GSH* се континуирано трошио, при чему редукција оксидованог у редуковани *GSH* и брзина његове синтезе из аминокиселина није била довољна за опоравак. У исто време, ствара се повећана концентрација РВК што узрокује оштећење можданог ткива. Ова објашњења потврђују повећање липидне пероксидације у експерименталној групи животиња након СТЗ апликације.

Након *iTBS* стимулације код животиња претходно третираних СТЗ-ом уочава се значајно повећање нивоа *GSH* и враћање антиоксидативног капацитета на контролни ниво у свим испитиваним структурама, док примена на здравим животињама не доводи до промена. Повећање *GSH* се последично одражава на претходно регистрована смањења прооксидативних и пронитрозативних параметара, као и липидне пероксидације.

Важно је напоменути да *GSH* обезбеђивањем одговарајућег редокс окружења за репликацију и очување интегритета ДНК има улогу у одржавању једарне хомеостазе (248) и са једне стране да директно штити ДНК од оксидативног оштећења, док додатно делује и као модулатор поправке ДНК (249). У складу са изнетим подацима, смањење *GSH* може делом објаснити повећане вредности 8-*OHdG* које су резултат ицв примене СТЗ. Са друге стране заштитни ефекат *iTBS* који се огледа у смањењу маркера оштећења ДНК може бити објашњен делом преко утицаја на *GSH*.

Као одговор на оксидативни стрес мења се концентрација слободних *SH* група, што је показатељ оксидације протеина и других тиола у ћелији. Резултати из других лабораторија показују смањење укупног тиолног садржаја и 21. дана након ицв давања СТЗ (250). Добијени резултати такође показују да осам седмица након примене СТЗ у свим испитиваним можданим структурама долази до значајног смањења *SH* група чиме се угрожава антиоксидативне заштита (Слика V 18.). Сулфхидрилне групе цистеина у глутатиону имају способност да донирају електроне како би неутралисала РВК и РВА. Даље, многи антиоксидативни ензими, као што су *SOD* и *GPx*, садрже *SH* групе у својој структури. Такође, *SH* групе помажу у спречавању оксидације липидних молекула у ћелијским мембранама, а могућношћу да се вежу за токсичне метале, омогућавају и њихову елиминацију (251). Смањење *SH* група индуковано токсином може се објаснити преоптерећеношћу ткивних хомеостатских механизма који не могу да заштите ткиво од оштећења. Са друге стране, примена *iTBS* на животиње претходно третиране СТЗ-ом повећала је у значајној мери ниво *SH* група у свим испитиваним структурама што потврђује антиоксидативни ефекат *iTBS* и објашњава добијено повећање других антиоксидативних параметара описаних након примене *iTBS* на овом животињском моделу.

Експресија антиоксидативних гена је делимично регулисана транскрипционим фактором *NRF2* који је важан за одржавање метаболичке и редокс хомеостазе (252). Оштећења *NRF2* се примећују код већине неуродегенеративних поремећаја, укључујући АБ (253, 254). У условима повећане производње РВК и РВА, *NRF2* улази у једро и везује се за *ARE* (255), који регулише експресију антиоксидативних и антиинфламаторних гена (256). У спроведеној студији упркос повишеним маркерима оксидативног стреса, осам седмица

након ицв апликације СТЗ, уочава се смањена експресија *NRF2* (Слика V 20.) у свим испитиваним можданим структурама пацова, што је у складу са постојећим подацима (196, 257). Овакви резултати указују да постоји оштећење на нивоу транслокације *NRF2* из цитоплазме у једро, али сугеришу и нарушену једарну активност *NRF2* (253).

Након десетодневне примене *iTBS* уочава се вишеструко повећање експресије *NRF2* у свим испитиваним структурама чиме се делом објашњава забележен пораст других параметара антиоксидативне заштите. Такође, примена *iTBS* на контролним животињама значајно повећава активност *NRF2* у свим регионима мозга у односу на групу са токсином. Друге студије спроведене на пацовским моделима Хантингтонове болести (258), олфакторне булбектомије (259) и експерименталног можданог инфаркта (256) потврђују антиоксидативни ефекат рТМС-а, сугеришући да може бити посредован путем *NRF2*. Претпоставља се да је на нивоу цитоплазме смањена активност *NRF2* повезана са повећањем регулације његовог инхибитора *Keap1* (енг. *Kelch-like ECH-associated protein 1*). И заиста, неки терапијски приступи који циљају *Keap1* доводе до смањења оксидативног стреса на моделу СТЗ-ом индуковане сАБ (196). Већина познатих *NRF2* активатора/ *ARE* индуктора су индиректни инхибитори интеракције *Keap1*– *NRF2* и то су електрофилне врсте које модификују *SH* групе цистеинских остатака *Keap1* (260). Горе изнети резултати о смањењеном нивоу *SH* група код животиња третираним СТЗ-ом, као и враћању на контролни ниво након *iTBS* можда могу пружити везу са модификацијом *Keap1*, односно активацијом *NRF2* и нисходном регулацијом антиоксидативних гена.

Даље, још један од фактора који иницира транслокацију *NRF2* у једро је *BDNF* (253, 261) чију експресију доказано модулише рТМС (267). За разлику од значајног смањења експресије *BDNF* у свим можданим структурама пацова након апликације токсина, примена *iTBS* код пацова након давања СТЗ доводи до значајног пораста експресије *BDNF* у свим испитиваним структурама (Слика V 24.). Разматрани заједно, резултати повећања експресије *NRF2* и *BDNF* посредовани *iTBS* протоколом би могли делимично објаснити побољшање укупног редокс статуса након примене СТЗ (101, 256, 268) . Поред тога, показано је да примена активатора *NRF2* опоравља оштећења меморије и побољшава синаптичку активност и пластичност у моделима АБ код глодара (253). Занимљиво је да су *BDNF* и *NRF2*, који су укључени у синаптичку пластичност, функције учења и памћења значајно нарушене након примене СТЗ (234, 269). После стимулације пак ове функције бивају обновљене, што би могло пружити додатно објашњење добијених резултата.

Антиоксидативни систем *Keap1-NRF2-ARE* највећим делом се приписује астроцитима, односно висок ниво активације *ARE* и нисходна експресија антиоксидативних гена су углавном ограничени на популације ћелија астроцита (270). Штавише, ендогени  $H_2O_2$  генерисан у астроцитима под одређеним условима може да заштити неуроне од оксидативног стреса активацијом *NRF2* који даље активира антиоксидативни одговор (271). Сви ови докази сугеришу да је астроцитни *NRF2* главни регулатор укључен у редокс хомеостазу ЦНС-а и да може бити обећавајућа мета за неуропротекцију. Веза између истовременог смањења реактивне астроглиозе и повећања *NRF2* активности на СТЗ моделу под утицајем *iTBS* додатно пружа увид у мождани пластицитет који је подстакнут стимулацијом. Ово даље значи да се неурони изложени оксидативном стресу ослањају на антиоксидативну подршку околних астроцита која се вероватно дешава посредством *NRF2*.

Сумирано, у овом животињском моделу, осам седмица након примене СТЗ се уочава нарушена редокс равнотежа изражена кроз повећан ниво прооксидативних и пронитрозативних параметара, као и параметара оксидативног/ нитрозативног оштећења биолошких молекула истовремено са смањењем ензимских и неензимских параметара антиоксидативног капацитета и повезаних транскрипционих фактора. Ови резултати потврђују да ицв примена СТЗ изазива хроничне дегенеративне промене у комбинацији са оксидативним дисбалансом, не само у структурама које се односе на процесе учења и памћења, већ и у готово свим испитиваним регионима мозга. Са друге стране, примена *iTBS* значајно враћа редокс равнотежу уочену кроз смањене нивое маркера оксидативног стреса уз истовремени пораст антиоксидативног капацитета (222) ослабљеног у неуротоксичности изазваној СТЗ-ом у свим испитиваним регионима мозга. Добијени резултати су показали да *iTBS* смањује оксидативна оштећења изазвана СТЗ-ом и обнавља антиоксидативни капацитет, што потврђује његово антиоксидативно деловање.

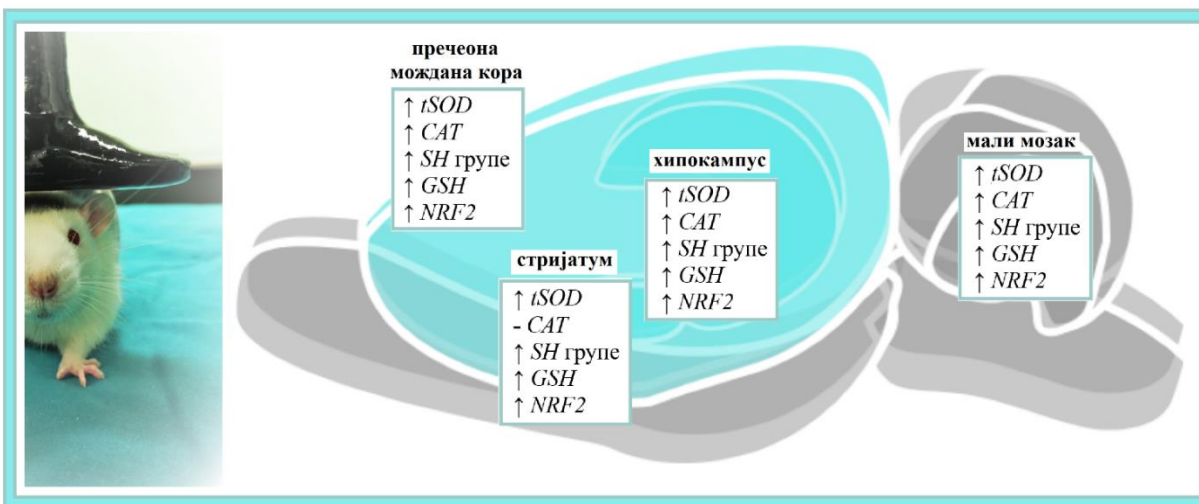


Схема VI 2. Схематизован приказ ензимске (*tSOD*, *CAT*) и неензимске (*GSH*, *SH*-групе) антиоксидативна заштите и регулација њихове експресије транскрипционим фактором (*NRF2*) у мозданим структурама модела АБ након примене *iTBS* протокола

Након увида у промене на нивоу учења и памћења, (ре)активности глија ћелија и оксидативног стреса, даља истраживања су усмерена на праћење нивоа *APP* и  $A\beta_{1-42}$  који се преплићу са поменути бихејвиоралним, морфолошким и биохемијским променама. Такође, патогенеза АБ и већине експерименталних модела АБ је тесно повезана са таложењем  $A\beta_{1-42}$ , што је потврђено у најновијим студијама других аутора и након примене СТЗ (179, 272).

У свим испитиваним структурама на експерименталном моделу уочава се вишеструко повећање концентрације *APP* након примене СТЗ (Слика V 21.). Међутим, истраживања других аутора указују на веома контрадикторне резултате концентрације *APP*. Неке од претходних студија (273) показују повећану експресију *APP* у пречеоној мозданој кори и хипокампусу *Wistar* пацова 30 дана након ицв примене СТЗ (3 mg/kg). *Retinasamy* и

сар. (274) су код *Sprague Dawley* пацова приметили повећање експресије гена за *APP* у пречеоној можданој кори и хипокампусу 21 дан након операције (СТЗ 3 mg/kg). Међутим, постоје и супротни подаци, као у студији *Zappa* и сарадника (211), у којој ицв апликација 1 и 3 mg/kg СТЗ не утиче на експресију *APP* у хипокампусу *Sprague Dawley* пацова након 25 дана. Такође, *Souza* и сар. (275) нису уочили промене у концентрацији *APP* у хипокампусу и пречеоној можданој кори *Wistar* пацова четири седмице након ицв примене СТЗ иако су описали оштећење краткорочног просторног памћења. У раду *Gupta* и сарадника (276), експресија гена *APP* је повећана само у можданој кори, али не и у хипокампусу *Sprague Dawley* пацова 30 дана након операције. Ове разлике вероватно произилазе из специфичности детаља експерименталног дизајна. Можемо претпоставити да одступање концентрација *APP* од контролне групе, на неки начин утиче на измену његових физиолошких функција као што су улоге у формирању синапси, процесима учења и памћења (34) и регулацији транспортних протеина у неуронима (277). Показано је да *APP* има кључну улогу у формирању и поправљању синапси и познато је да се појачано ствара током повреде неурона (278). У том смислу, повећање експресије *APP* се може приписати регенеративном покушају неурона да се супротставе неуронској повреди изазваној СТЗ-ом (279).

Након десет *iTBS* третмана уочава се смањење концентрације *APP* изазвано СТЗ-ом у свим испитиваним структурама али без статистичке значајности у региону хипокампуса и малог мозга. Може се претпоставити да смањење оксидативног стреса и неуроинфламације након *iTBS* третмана последично доводи до смањења концентрације *APP*.

Амилоидни прекурсорски протеин је сложен молекул који пролази кроз значајну посттранслациону модификацију и идентификовано је најмање десет различитих протеолитичких фрагмената *APP* од којих су неки патогени, док су други неуропротективни (280). Свакако да повећане концентрације *APP* могу указивати на могућност повећаног стварања  $A\beta_{1-42}$  што је такође забележено у истраживању у свим испитиваним структурама након примене СТЗ (Слика V 22.).

Повећане концентрације  $A\beta_{1-42}$  могу објаснити забележене промене у учењу и памћењу након примене СТЗ. Симптоми попут оштећене радне и референтне меморије се релативно поуздано репродукују у експерименталним моделима АБ и углавном показују корелацију са присуством амилоидних плакова и повећаном концентрацијом  $A\beta_{1-42}$  (64, 179). Међутим, постоје бројни докази који оспоравају везу између присуства плакова и нарушеног памћења, па тако смањене функције учења и памћења у неким случајевима претходе детекцији плакова у СТЗ индукованом моделу (69). Слично, постоје случајеви и у другим моделима где се оштећење памћења уочава пре потврђивања амилоидне патологије (281). Штавише, когнитивни дефицити код пацијената такође немају строгу корелацију са амилоидном патологијом (282), што може објаснити велике клиничке неуспехе антиамилоидних стратегија у лечењу АБ (43). Све ово указује на комплексност патогенезе АБ која се не може посматрати кроз један параметар, као и мањкавост експерименталних модела који не одражавају верно све аспекте ове патологије. Даље, о прецизном времену појаве плакова у СТЗ индукованом моделу сАБ постоје различити подаци који очито зависе од многих фактора, као што су животињска врста, примењена доза токсина и методологија евалуације. Шалковић-Петришић и *Hoyer* (64) су, користећи конго црвено бојење показали присуство патолошких А $\beta$  агрегата у менингеалним капиларима три месеца након ицв примене СТЗ, док *Кнезовић* и сар. (69) бележе ванћелијску  $A\beta_{1-42}$  имунореактивност у облику агрегата у неокортексу и хипокампусу шест месеци након ицв примене СТЗ. Са друге

стране, наши резултати показују присуство повећаних концентрације  $A\beta_{1-42}$  непуна два месеца након апликације СТЗ, што нужно не осликава одсуство/ присуство плакова.

Сматра се да  $A\beta_{42}$  олигомери ометају функцију синапсе доприносећи оштећењу учења и памћења (283). Ови олигомери изазивају оксидативно оштећење синаптичких мембрана (284), што сугерише да постоји веза између оксидативног оштећења изазваног олигомерима и синаптичке дисфункције. Показано је да велики олигомери, који би имали потешкоћа да се растворе у неуронском липидном двослоју, не испољавају токсичност, док су мали олигомери (на пример, димери или тримери, који лако улазе у двослој липида) веома токсични за синапсе (285). Ова разматрања подржавају идеју да липидна пероксидација, као и други облици оксидативног оштећења мембрана, па тако и синаптичких мембрана, нарушавају структуру и функцију синапси, нарушавајући тако процесе *LTP* на којима се заснива памћење (284, 286, 287). Ово би стога било објашњење везе између уоченог повећања  $A\beta_{1-42}$ , продуката липидне пероксидације (*TBARS*) и промена у тестовима понашања након апликације СТЗ.

Сматрано је да само неурони експримирају *BACE1*, односно да су ово једине ћелије у нервном систему способне да производе  $A\beta$  (288). Међутим, *post-mortem* студије на мозговима пацијената оболелих од АБ су показале да астроцити експримирају довољно високе нивое *BACE1* за синтезу  $A\beta$  (289). Ово доводи до претпоставке да реактивни астроцити могу довести до повећане експресије *BACE1* и последично стварања амилоида.

Прецизан механизам којим десет третмана *iTBS* доводи до смањења концентрације  $A\beta_{42}$  у свим испитиваним структурама у СТЗ индукованом моделу није могуће у потпуности реконструисати, али се на основу претходно изнетих података могу претпоставити догађаји који доводе до оваквих резултата. Смањена концентрација *APP* под утицајем *iTBS* можда може објаснити смањење  $A\beta_{42}$ . Чак су *Wang* и сар. (280) предложили да  $A\beta$  посредована оштећења синаптичке пластичности зависе од експресије *APP*. Уочено смањење реактивне астроглиозе након *iTBS* такође може довести до смањене експресије *BACE1* и последичног смањења концентрације  $A\beta_{42}$ . И најзад, смањење оксидативног стреса као последица примене *iTBS* доводи до опоравка ћелијске хомеостазе, односно смањених услова за стварање токсичних продуката.

Повећана производња *APP* иницира различите ћелијске сигналне каскаде, међу којима је транскрипција гена за *EGR1* (290) који, између осталог, може регулисати и нивое  $A\beta$  (291). У спроведеној студији, детектовано повећање концентрације *EGR1* у свим испитиваним структурама након примене СТЗ је у сагласности са постојећим подацима (216) и може објаснити везу између повећаних нивоа *APP*, *EGR1* и  $A\beta_{1-42}$  у СТЗ индукованом моделу сАБ (Схема VI 3). Претпоставља се да *EGR1* има улогу у транскрипционој активацији *BACE-1* и промовисању синтезе  $A\beta$  у мозгу оболелих од АБ (291). Десет третмана *iTBS* смањује СТЗ-ом изазвано повећање концентрације *EGR1* у свим испитиваним структурама што може бити последица смањеног нивоа *APP* под утицајем стимулације. Такође, недавна студија сугерише да ометано везивање *EGR1* за промотор *BACE1* блокира активацију *APP* сигнализације испољавајући протективни ефекат на неуроне (292), односно показано је да супресија *EGR1* ублажава патологију АБ (292).

Значајно је напоменути да је *EGR1* важан посредник и регулатор неуронске активности и да учествује у формирању меморије, како у физиолошким тако и у патолошким стањима (293). Поред *APP*, широки спектар стимулуса из околине регулише *EGR1* који даље

контролише велики транскрипциони програм синаптичке машинерије. Као резултат тога, *EGR1* представља кључни фактор како у интеграцији перцепције околине, тако и у обликовању одговарајућег одговора. У овом контексту, очекивано је успостављање везе између *EGR1* и неуродегенеративних болести у којима је измењена синаптичка пластичност и активност неурона (293). Даље, ово може упутити на однос између смањења концентрације *EGR1* и побољшаних функција учења и памћења и дати нову перспективу заштитном ефекту *iTBS*.

Један од важних посредника у заштитној улози коју *iTBS* испољава на функције просторног учења и памћења је *BDNF*. Најважније функције *BDNF* укључују регулацију неуро-, глио- и синаптогенезе, неуропротекцију и контролу краткотрајних и дуготрајних синаптичких интеракција које утичу на механизме памћења и друге когнитивне функције. Због своје улоге у *LTP*, *BDNF* је фундаментални део ћелијског механизма који подржава формирање, одржавање и складиштење меморије промовишући синаптичку консолидацију и индуковање промена у морфологији трноликих наставака. На функције *BDNF* утичу бројни фактори попут стадијума развоја мозга, различитих ћелијских компоненти нервног ткива, као и молекуларних механизма трансдукције сигнала који се активирају у физиолошким и патолошким условима (294).

У свим испитиваним структурама, уочавају се значајно снижене концентрације *BDNF*, што указује на нарушене физиолошке улоге *BDNF* и објашњава резултате оштећеног просторног памћења и учења код *Wistar* пацова осам недеља након примене СТЗ (Слика V 24.). У погледу регионалне дистрибуције, информациона РНК за *BDNF* је детектована у свим регионима мозга, међу којима се највећи нивои налазе у хипокампусу и малом мозгу (295) што додатно потврђује регистроване промене у тестовима понашања које су под контролом поменутих можданих региона. Смањени нивои *BDNF* се уочавају и у нормалним условима старења, али и у патолошким стањима укључујући АБ, где су највећи дефицити уочени у хипокампусу, теменој, енториналној и чеоној можданој кори (296). Уочено је и да је ниво *BDNF* у корелацији са степеном оштећења епизодног памћења код пацијената (297). Постоје бројни подаци о нарушеној синтези и секрецији *BDNF* у различитим фазама прогресије АБ, а који су повезани са абнормалном акумулацијом А $\beta$ , синаптичким оштећењем, когнитивном дисфункцијом (298, 299) и оксидативним стресом (300).

У *in vitro* условима А $\beta$  редукује активацију *CREB* протеина (енг. *cAMP-response element binding protein*) и смањује ниво информационе РНК за *BDNF* (301) чиме директно нарушава ретроградни аксонски транспорт *BDNF* (302). Чак и у малим концентрацијама, А $\beta$  омета синаптичку пластичност посредовану *BDNF* -ом (303), што значи да се ова дисфункција дешава пре појаве плакова и повезана је са дефицитом памћења код животињских модела АБ (304). Наши резултати такође показују повећан ниво А $\beta_{1-42}$  и смањен ниво *BDNF* истовремено са оштећеним памћењем у СТЗ индукованом моделу сАБ што се вероватно дешава пре појаве плакова. Конкретна анализа за прецизну детекцију плакова није извршена, али се на основу података из литературе претпоставља одсуство плакова након ицв примене СТЗ (64, 69). Ови подаци указују да промене у експресији *BDNF* могу бити ефекат ранијих функционалних модификација протеина повезаним са синапсом попут А $\beta$ , који у свом мономерном облику имају нормалну физиолошку улогу у синаптичкој пластичности и преживљавању неурона у мозгу и последично могу имати активну улогу у променама *BDNF* регулацијом транскрипције и ослобађања *BDNF* (305).

Након десет третмана *iTBS* уочава се пораст нивоа *BDNF* у свим испитиваним структурама чије смањење је претходно изазвано применом СТЗ. Подаци из ранијих експеримената са животињским моделима АБ указују да се рТМС супротставља смањењу *BDNF* (128). Такође је потврђено и на другим анималним моделима да механизам путем којег *iTBS* доводи до побољшања *LTP* у пречеоној можданој кори укључује *BDNF* (306). Неуропротективни ефекти рТМС су посредством *BDNF* повезани са модулацијом *NMDAR*/ $\text{Ca}^{2+}$ - зависне сигнализације (307). Отварање *NMDAR* повећава улазак  $\text{Ca}^{2+}$  и активира неколико сигналних путева који индукују дугорочне промене у пресинаптичким и постсинаптичким неуронима што на крају доводи до ојачавања синапси (308). Заштитни ефекат *BDNF* је повезан и са супримирањем екситотоксичности, која је резултат инхибиције вансинаптичког *NMDAR* -посредованог уласка  $\text{Ca}^{2+}$ , што затим одржава функцију митохондрија и спречава апоптозу која се уочава у току неуродегенеративних болести (309). Неуропротективни ефекат се такође може постићи синаптичком стимулацијом *NMDAR* и накнадним повећањем уласка  $\text{Ca}^{2+}$  у једру, што резултује активацијом *CREB* и повећаном експресијом гена који кодирају протеине укључене у неуропротекцију (310, 311). Наведени механизми омогућавају одређивање судбине неурона током развоја мозга и у одраслом добу. Оштећење ових механизма је показано код неуродегенеративних болести, укључујући и АБ (308).

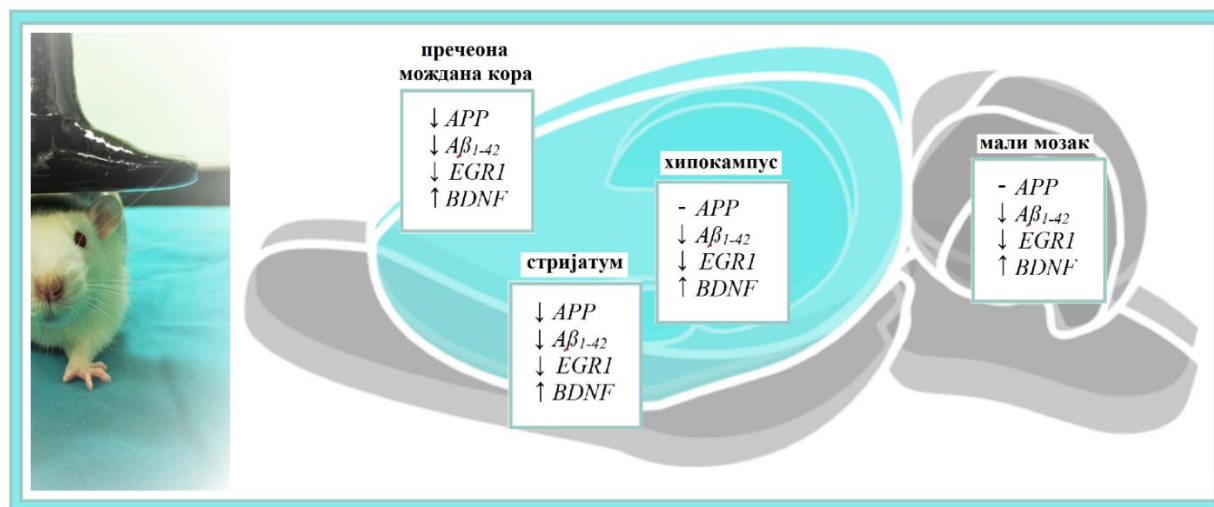


Схема VI 3. Схематизован приказ регулатора (*EGR1*) експресије амилоидних протеина (*APP*; *Aβeta*) и регулатора пластичности синапси (*BDNF*) у можданим структурама модела АБ након примене *iTBS* протокола

Веома важна компонента синаптичке активности која је разматрана у спроведеном експерименту је глутаматни транспортер 1 (*GLT-1*) код глодара који је аналоган *EAAT2* код људи. Екситаторни транспортер аминокиселина 2 представља доминантни транспортер глутамата у можданој кори и хипокампусу који је превасходно изражен на астроцитима, а нешто мање на аксонима (312). Поред тога што има кључну улогу у превенцији екситотоксичности посредоване глутаматом (313) *GLT-1* модулише нормалне синаптичке интеракције и неуралну пластичност (314, 315). Аберантна стимулација глутаматом може изазвати синаптичку дисфункцију, што је предложено као један од неколико механизма



којима се оштећују синапсе у АБ (316, 317). Код пацијената, али и на експерименталним моделима АБ се уочава промена функционалне експресије *EAAT2* (318) односно *GLT-1* (319). Постоје докази да на експресију *EAAT2* могу утицати растворљиви облици  $A\beta$ , посебно  $A\beta_{1-42}$ , који се често сматра главном изоформом  $A\beta$  која изазива патолошке промене у АБ (320). Такође, оштећење *EAAT2*, у контексту смањеног капацитета глутаматног транспортера и селективни губитак везикуларних глутаматних транспортера са истовременим порастом ванћелијске концентрације глутамата (321, 322) аутори приписују оштећењу проузрокованом продукцијом липидне пероксидације и РВК (323).

У експерименту након ицв примене СТЗ нису примећене промене у експресији *EAAT2* протеина у пречеаној можданој кори и хипокампусу *Wistar* пацова, а такође изостаје ефекат *iTBS* на здравим пацовима и онима третираним са СТЗ-ом. Добијени резултати нису у складу са новијом студијом у којој је показано да примена СТЗ индукује смањену експресију протеина глутаматних рецептора (324). Ипак, ни неке друге студије нису показале промене у експресији *EAAT2* у АБ. У цингуларној и инфериорној слепоочној вијуги већине пацијената са АБ, нивои протеина *EAAT2* су добро очувани (325). Експресија *EAAT2* је такође очувана у чеаној можданој кори у узнапредовалим стадијумима АБ (326). Недавна студија која је извршила свеобухватно испитивање експресије *EAAT2* у хипокампусу, субикулуму, енторхиалној кори и горњој слепоочној вијуги, такође не показује промену густине *EAAT2* у АБ у поређењу са контролом (327). У ревијском раду *Wood* и сар. из 2022. године подаци о повећању, односно смањењу *EAAT2* су контрадикторни, чак и у оквиру истих региона мозга (318).

Такође, резултати нису кохерентни ни што се тиче примене рТМС. Индиректна реакција астроцита на стимулацију се остварује преко промене неуронске активности. Под утицајем електричне стимулације, мења се акциони потенцијал неурона, а самим тим и количина неуротрансмитера попут глутамата које из синаптичке пукотине уклањају астроцити. Унос глутамата у астроците се дешава преко *VGLUT1* транспортера, који се применом рТМС регулише на дозно-зависан начин у чеаној, моторној, соматосензорној и визуелној можданој кори пацова, (152). Стога, као одговор на ТМС, вероватно је да астроцити детектују повећану активност неурона и да у складу са тим прилагођавају експресију *VGLUT1* како би се глутамат ефикасно уклонио из синаптичке пукотине (147). Са друге стране, вишекратна примена *iTBS* на здравим *Wistar* пацовима смањује експресију ГЛТ-1 у хипокампусу и малом мозгу, док нема утицаја у стријатуму и моторној кори (328). Узевши у обзир да је у оквиру истог експеримента једнократна примена *iTBS* показала повећање ГЛТ-1 у истим структурама, аутори су то објаснили стањем индуковане толеранције, односно прекондиционирањем.

Несклад података у вези са експресијом *EAAT2* након примене СТЗ, односно након стимулације се може приписати различитим експерименталним методологијама. Неколико техничких проблема може довести до лажно позитивних налаза. Приликом бојења ткивних пресека слабо везивање антитела може узроковати неспецифично позадинско бојење (329). Разлике у методологији обраде ткива такође могу допринети променљивим налазима у вези са локализацијом и нивоима експресије *EAAT2* протеина. И без обзира на брзу обраду ткива након жртвовања животиња, одређени постмортални услови се не могу контролисати или корелирати са обрасцима експресије транспортера (318). Биће потребне даље студије како би се истражио образац промена *EAAT2* након СТЗ, односно *iTBS*.

На крају, важно је истаћи/ указати на ограничења изведене студије. Како је калем већи од мозга пацова, не може се постићи селективна и прецизна стимулација различитих кортикалних области (103). Стога, уочене промене изазване *iTBS*-ом су вероватно резултат стимулације субкортикалних и кортикалних структура и њихових међусобних веза. Треба напоменути да бројни фактори као што су величина, облик и оријентација калема, место стимулације, интензитет, учесталост и број сесија утичу на индукцију дуготрајних промена у кортикалној и субкортикалној ексцитабилности, и можда будућа истраживања треба усмерити на прецизнију стимулацију.

Уочене промене под утицајем *iTBS* протокола указују на потенцијал овог типа стимулације у терапијском приступу неуроинфламаторним болестима које резултују оштећеним учењем и памћењем, као што је АБ. Свеукупно, резултати указују на могућност примене *iTBS* као додатне терапије за АБ, јер испољава антиоксидативна, антиамилоидогена и антиинфламаторна својства у животињском моделу СТЗ-индуковане патологија сАБ.

## VII ZAKЉUČCI

1. Интрацеребровентрикуларна апликација стрептозотоцина (СТЗ; једнократно, 3 mg/kg) 30 дана након примене не доводи до промена моторне координације и равнотеже код *Wistar* пацова

2. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ оштећује параметре понашања (учење и памћење; меморијски учинак, радна и референтна меморија), док десетодневна примена *iTBS* побољшава поменуте параметре код *Wistar* пацова након стимулације.

3. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до дискретних морфолошких промена неурона у региону СА3 вентралног хипокампуса, перивентрикуларној области, каудопутамену и медијалној хабенули *Wistar* пацова након примене.

4. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до повећане имунореактивности *Iba+* ћелија, док десетодневна примена *iTBS* смањује микроглиозу у *gyrus dentatus*, фимбрији, СА1 региону дорзалног хипокампуса, медијалној хабенули, пречеоној можданој кори и каудопутамену *Wistar* пацова након стимулације.

5. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ узрокује благо до умерено повећање имунореактивности *GFAP+/ VIM+* ћелија, док десетодневна примена *iTBS* смањује астроглиозу у хипокампусу, фимбрији и перивентрикуларној области каудопутамена *Wistar* пацова након стимулације.

6. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до повећаног стварања прооксидативних (супероксидни ањон радикал -  $O_2^{\bullet-}$ ) и пронитрозативних параметара (азот оксид -  $NO_2 + NO_3$ ), док десетодневна примена *iTBS* смањује поменуте параметре у ткиву пречеоне мождане коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга *Wistar* пацова након стимулације

7. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до повећања параметара оксидативног оштећења ћелијских мембрана (малондиалдехид – *MDA*) и оксидативног оштећења ДНК (8-хидрокси-2'-деоксигуанозин - *8-OHdG*), док десетодневна примена *iTBS* смањује поменуте параметре у ткиву пречеоне мождане коре, стријатума и малог мозга *Wistar* пацова након стимулације.

8. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до смањења параметара антиоксидативне заштите - супероксид дизмутазе (*tSOD*), каталазе (*CAT*), глутатиона (*GSH*) и сулфхидрила (*SH* групе), као и фактора регулације експресије антиоксидативних протеина нуклеарног фактора 2 (*NRF2*), док десетодневна примена *iTBS* повећава поменуте параметре у ткиву пречеоне мождане коре, хипокампуса и малог мозга *Wistar* пацова након стимулације.

9. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до повећања концентрације протеина одговора на рани фактор раста 1 (*EGFR*) и амилоидних протеина (амилоидни прекурсорски протеин - *APP*,  $\beta$  амилоид -  $A\beta_{1-42}$ ), док десетодневна примена *iTBS* смањује поменуте параметре у ткиву пречеоне мождане коре и стријатума *Wistar* пацова након стимулације.

10. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до смањења експресије неуротрофичног фактора можданог порекла (*BDNF*), док десетодневна примена *iTBS* повећава овај секреторни протеин у ткиву пречеоне мождане коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга *Wistar* пацова након стимулације.

11. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ нема утицај на експресију мембранског транспортера за ексцитаторне аминокиселине 2 (*EAAAT2*), као ни десетодневна примена *iTBS* у ткиву пречеоне мождане коре и хипокампуса *Wistar* пацова након стимулације.

## VIII ЛІТЕРАТУРА

1. Ferrari C, Sorbi S. The complexity of Alzheimer's disease: an evolving puzzle. *Physiol Rev.* 2021 Jul 1;101(3):1047-1081.
2. [World Alzheimer Report 2021: Journey through the diagnosis of dementia \(alzint.org\)](https://www.alzint.org/)
3. James BD, Wilson RS, Boyle PA, Trojanowski JQ, Bennett DA, Schneider JA. TDP-43 stage, mixed pathologies, and clinical Alzheimer's-type dementia. *Brain.* 2016 Nov 1;139(11):2983-2993.
4. Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci.* 2009;11(2):111-28.
5. Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Brayne C, Burns A, Cohen-Mansfield J, Cooper C, Costafreda SG, Dias A, Fox N, Gitlin LN, Howard R, Kales HC, Kivimäki M, Larson EB, Ogunniyi A, Orgeta V, Ritchie K, Rockwood K, Sampson EL, Samus Q, Schneider LS, Selbæk G, Teri L, Mukadam N. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet.* 2020 Aug 8;396(10248):413-446.
6. Stern Y, Albert S, Tang MX, Tsai WY. Rate of memory decline in AD is related to education and occupation: cognitive reserve? *Neurology.* 1999 Dec 10;53(9):1942-7.
7. Whitwell JL. Progression of atrophy in Alzheimer's disease and related disorders. *Neurotox Res.* 2010 Nov;18(3-4):339-46.
8. Zhang Y, Schuff N, Du AT, Rosen HJ, Kramer JH, Gorno-Tempini ML, Miller BL, Weiner MW. White matter damage in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease measured by diffusion MRI. *Brain.* 2009 Sep;132(Pt 9):2579-92.
9. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron.* 2012 May 24;74(4):691-705.
10. Frost JL, Schafer DP. Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends Cell Biol.* 2016 Aug;26(8):587-597.
11. Rajendran L, Paolicelli RC. Microglia-Mediated Synapse Loss in Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 2018 Mar 21;38(12):2911-2919.
12. Plescher M, Seifert G, Hansen JN, Bedner P, Steinhäuser C, Halle A. Plaque-dependent morphological and electrophysiological heterogeneity of microglia in an Alzheimer's disease mouse model. *Glia.* 2018 Jul;66(7):1464-1480.
13. Yin Z, Raj D, Saiepour N, Van Dam D, Brouwer N, Holtman IR, Eggen BJL, Möller T, Tamm JA, Abdourahman A, Hol EM, Kamphuis W, Bayer TA, De Deyn PP, Boddeke E. Immune hyperreactivity of A $\beta$  plaque-associated microglia in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2017 Jul;55:115-122.
14. Nguyen HM, Grössinger EM, Horiuchi M, Davis KW, Jin LW, Maezawa I, Wulff H. Differential Kv1.3, KCa3.1, and Kir2.1 expression in "classically" and "alternatively" activated microglia. *Glia.* 2017 Jan;65(1):106-121.

15. Ismail R, Parbo P, Madsen LS, Hansen AK, Hansen KV, Schaldemose JL, Kjeldsen PL, Stokholm MG, Gottrup H, Eskildsen SF, Brooks DJ. The relationships between neuroinflammation, beta-amyloid and tau deposition in Alzheimer's disease: a longitudinal PET study. *J Neuroinflammation*. 2020 May 6;17(1):151.
16. Hanzel CE, Pichet-Binette A, Pimentel LS, Iulita MF, Allard S, Ducatenzeiler A, Do Carmo S, Cuellar AC. Neuronal driven pre-plaque inflammation in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2014 Oct;35(10):2249-62.
17. Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol*. 2021 Mar;17(3):157-172.
18. Fakhoury M. Microglia and Astrocytes in Alzheimer's Disease: Implications for Therapy. *Curr Neuropharmacol*. 2018;16(5):508-518.
19. Cunningham C, Wilcockson DC, Champion S, Lunnon K, Perry VH. Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *J Neurosci*. 2005 Oct 5;25(40):9275-84.
20. Holmes C, El-Okli M, Williams AL, Cunningham C, Wilcockson D, Perry VH. Systemic infection, interleukin 1beta, and cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003 Jun;74(6):788-9.
21. Streit WJ, Khoshbouei H, Bechmann I. The Role of Microglia in Sporadic Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2021;79(3):961-968.
22. Khakh BS, Deneen B. The Emerging Nature of Astrocyte Diversity. *Annu Rev Neurosci*. 2019 Jul 8;42:187-207.
23. Huang AY, Woo J, Sardar D, Lozzi B, Bosquez Huerta NA, Lin CJ, Felice D, Jain A, Paulucci-Holthausen A, Deneen B. Region-Specific Transcriptional Control of Astrocyte Function Oversees Local Circuit Activities. *Neuron*. 2020 Jun 17;106(6):992-1008.e9.
24. Dallérac G, Rouach N. Astrocytes as new targets to improve cognitive functions. *Prog Neurobiol*. 2016 Sep;144:48-67.
25. Monterey MD, Wei H, Wu X, Wu JQ. The Many Faces of Astrocytes in Alzheimer's Disease. *Front Neurol*. 2021 Aug 31;12:619626.
26. Jacob CP, Koutsilieri E, Bartl J, Neuen-Jacob E, Arzberger T, Zander N, Ravid R, Roggendorf W, Riederer P, Grünblatt E. Alterations in expression of glutamatergic transporters and receptors in sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2007 Mar;11(1):97-116
27. Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhäuser C, Lee JM, Parpura V, Hol EM, Sofroniew MV, Verkhratsky A. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol*. 2016 Mar;131(3):323-45.
28. Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, Steinhäuser C, Volterra A, Carmignoto G, Agarwal A, Allen NJ, Araque A, Barbeito L, Barzilai A, Bergles DE, Bonvento G, Butt AM, Chen WT, Cohen-Salmon M, Cunningham C, Deneen B, De Strooper B, Díaz-Castro B, Farina C, Freeman M, Gallo V, Goldman JE, Goldman SA, Götz M, Gutiérrez A, Haydon PG, Heiland DH, Hol EM, Holt MG, Iino M, Kastanenka KV, Kettenmann H, Khakh BS,

Koizumi S, Lee CJ, Liddel SA, MacVicar BA, Magistretti P, Messing A, Mishra A, Molofsky AV, Murai KK, Norris CM, Okada S, Olie SHR, Oliveira JF, Panatier A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Pellerin L, Perea G, Pérez-Nievas BG, Pfrieger FW, Poskanzer KE, Quintana FJ, Ransohoff RM, Riquelme-Perez M, Robel S, Rose CR, Rothstein JD, Rouach N, Rowitch DH, Semyanov A, Sirko S, Sontheimer H, Swanson RA, Vitorica J, Wanner IB, Wood LB, Wu J, Zheng B, Zimmer ER, Zorec R, Sofroniew MV, Verkhratsky A. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci.* 2021 Mar;24(3):312-325.

29. Guo T, Zhang D, Zeng Y, Huang TY, Xu H, Zhao Y. Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2020 Jul 16;15(1):40.

30. Li K, Li J, Zheng J, Qin S. Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Aging Dis.* 2019 Jun 1;10(3):664-675.

31. Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003 Feb;23(2):137-49.

32. Verkhratsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh CY, Rodriguez JJ. Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics.* 2010 Oct;7(4):399-412.

33. Chen Y, Qin C, Huang J, Tang X, Liu C, Huang K, Xu J, Guo G, Tong A, Zhou L. The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. *Cell Prolif.* 2020 Mar;53(3):e12781.

34. Müller UC, Deller T. Editorial: The Physiological Functions of the APP Gene Family. *Front Mol Neurosci.* 2017 Oct 23;10:334.

35. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 May;2(5):a006270.

36. Hefter D, Kaiser M, Weyer SW, Papageorgiou IE, Both M, Kann O, Müller UC, Draguhn A. Amyloid Precursor Protein Protects Neuronal Network Function after Hypoxia via Control of Voltage-Gated Calcium Channels. *J Neurosci.* 2016 Aug 10;36(32):8356-71.

37. Mockett BG, Richter M, Abraham WC, Müller UC. Therapeutic Potential of Secreted Amyloid Precursor Protein APPs $\alpha$ . *Front Mol Neurosci.* 2017 Feb 7;10:30.

38. Dong S, Duan Y, Hu Y, Zhao Z. Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a re-evaluation of amyloid cascade hypothesis. *Transl Neurodegener.* 2012 Sep 21;1(1):18.

39. Zhong L, Wang Z, Wang D, Wang Z, Martens YA, Wu L, Xu Y, Wang K, Li J, Huang R, Can D, Xu H, Bu G, Chen XF. Amyloid-beta modulates microglial responses by binding to the triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2). *Mol Neurodegener.* 2018 Mar 27;13(1):15.

40. Jovanović Z. Mehanizmi neurodegeneracije kod Alchajmerove bolesti. *Medicinski pregled.* 2012;65(7-8):301-7.

41. Edison P, Archer HA, Hinz R, Hammers A, Pavese N, Tai YF, Hotton G, Cutler D, Fox N, Kennedy A, Rossor M, Brooks DJ. Amyloid, hypometabolism, and cognition in Alzheimer disease: an [11C]PIB and [18F]FDG PET study. *Neurology.* 2007 Feb 13;68(7):501-8.

42. Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 2018 Jan 30;12:25.
43. van Dyck CH. Anti-Amyloid- $\beta$  Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: Pitfalls and Promise. *Biol Psychiatry.* 2018 Feb 15;83(4):311-319.
44. Wang S, Mims PN, Roman RJ, Fan F. Is Beta-Amyloid Accumulation a Cause or Consequence of Alzheimer's Disease? *J Alzheimers Parkinsonism Dement.* 2016;1(2):007.
45. Kang S, Lee YH, Lee JE. Metabolism-Centric Overview of the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Yonsei Med J.* 2017 May;58(3):479-488.
46. Kellar D, Craft S. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and related disorders: mechanisms and therapeutic approaches. *Lancet Neurol.* 2020 Sep;19(9):758-766.
47. Michailidis M, Moraitou D, Tata DA, Kalinderi K, Papamitsou T, Papaliagkas V. Alzheimer's Disease as Type 3 Diabetes: Common Pathophysiological Mechanisms between Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 28;23(5):2687.
47. Kamat PK. Streptozotocin induced Alzheimer's disease like changes and the underlying neural degeneration and regeneration mechanism. *Neural Regen Res.* 2015 Jul;10(7):1050-2.
48. Frölich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, Muschner D, Thalheimer A, Türk A, Hoyer S, Zöchling R, Boissl KW, Jellinger K, Riederer P. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 1998;105(4-5):423-38.
49. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50(6):537-46.
50. Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, Riederer P. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J Neural Transm (Vienna).* 2013 Jan;120(1):233-52.
51. Kamat PK, Kalani A, Rai S, Tota SK, Kumar A, Ahmad AS. Streptozotocin Intracerebroventricular-Induced Neurotoxicity and Brain Insulin Resistance: a Therapeutic Intervention for Treatment of Sporadic Alzheimer's Disease (sAD)-Like Pathology. *Mol Neurobiol.* 2016 Sep;53(7):4548-62.
52. Gai W, Schott-Ohly P, Schulte im Walde S, Gleichmann H. Differential target molecules for toxicity induced by streptozotocin and alloxan in pancreatic islets of mice in vitro. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2004 Jan;112(1):29-37.
53. Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci.* 1998 Oct;112(5):1199-208.
54. Nitsch R, Hoyer S. Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in rat brain cortex. *Neurosci Lett.* 1991 Jul 22;128(2):199-202.



55. Duelli R, Schröck H, Kuschinsky W, Hoyer S. Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *Int J Dev Neurosci*. 1994 Dec;12(8):737-43.
56. Sonkusare S, Srinivasan K, Kaul C, Ramarao P. Effect of donepezil and lercanidipine on memory impairment induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Life Sci*. 2005 May 20;77(1):1-14.
57. Sharma M, Gupta YK. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. *Life Sci*. 2001 Jan 19;68(9):1021-9.
58. Gella A, Durany N. Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adh Migr*. 2009 Jan-Mar;3(1):88-93.
59. Ishrat T, Khan MB, Hoda MN, Yousuf S, Ahmad M, Ansari MA, Ahmad AS, Islam F. Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Behav Brain Res*. 2006 Jul 15;171(1):9-16.
60. Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Schorer-Apelbaum D, Weinstock M. Ladostigil prevents gliosis, oxidative-nitrative stress and memory deficits induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Neuropharmacology*. 2007 Mar;52(3):836-43.
61. Prickaerts J, De Vente J, Honig W, Steinbusch H, Ittersum MMV, Blokland A, Steinbusch HW. Nitric oxide synthase does not mediate neurotoxicity after an i.c.v. injection of streptozotocin in the rat. *J Neural Transm (Vienna)*. 2000;107(7):745-66.
62. Moreira-Silva D, Carrettiero DC, Oliveira ASA, Rodrigues S, Dos Santos-Lopes J, Canas PM, Cunha RA, Almeida MC, Ferreira TL. Anandamide Effects in a Streptozotocin-Induced Alzheimer's Disease-Like Sporadic Dementia in Rats. *Front Neurosci*. 2018 Sep 21;12:653.
63. Bassani TB, Bonato JM, Machado MMF, Cópola-Segovia V, Moura ELR, Zanata SM, Oliveira RMMW, Vital MABF. Decrease in Adult Neurogenesis and Neuroinflammation Are Involved in Spatial Memory Impairment in the Streptozotocin-Induced Model of Sporadic Alzheimer's Disease in Rats. *Mol Neurobiol*. 2018 May;55(5):4280-4296.
64. Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J Neural Transm Suppl*. 2007;(72):217-33.
65. Grünblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J Neurochem*. 2007 May;101(3):757-70.
66. Luo H, Xiang Y, Qu X, Liu H, Liu C, Li G, Han L, Qin X. Apelin-13 Suppresses Neuroinflammation Against Cognitive Deficit in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Alzheimer's Disease Through Activation of BDNF-TrkB Signaling Pathway. *Front Pharmacol*. 2019 Apr 16;10:395.
67. Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Effect of naringenin on intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive deficits in rat: a behavioral analysis. *Pharmacology*. 2006;78(4):193-7.

68. Grieb P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Mol Neurobiol.* 2016 Apr;53(3):1741-1752.
69. Knezovic A, Osmanovic-Barilar J, Curlin M, Hof PR, Simic G, Riederer P, Salkovic-Petrisic M. Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 2015 Apr;122(4):577-92.
70. Santos TO, Mazucanti CH, Xavier GF, Torrão AS. Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. *Physiol Behav.* 2012 Oct 10;107(3):401-13.
71. Cai Z, Xiao M, Chang L, Yan LJ. Role of insulin resistance in Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis.* 2015 Aug;30(4):839-51.
72. Gasparini L, Gouras GK, Wang R, Gross RS, Beal MF, Greengard P, Xu H. Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *J Neurosci.* 2001 Apr 15;21(8):2561-70.
73. Gasparini L, Netzer WJ, Greengard P, Xu H. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci.* 2002 Jun;23(6):288-93.
74. Hong M, Chen DC, Klein PS, Lee VM. Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem.* 1997 Oct 3;272(40):25326-32.
75. Mandelkow EM, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Van Lint J, Vandenheede JR, Mandelkow E. Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett.* 1992 Dec 21;314(3):315-21.
76. Salkovic-Petrisic M, Osmanovic-Barilar J, Brückner MK, Hoyer S, Arendt T, Riederer P. Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: a long-term follow up study. *J Neural Transm (Vienna).* 2011 May;118(5):765-72.
77. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 2017 Jun 20;86:715-748.
78. Đukić M. Oksidativni stres - Kliničko dijagnostički značaj. Beograd: Mono i Manjana; 2008.
79. Forman HJ, Maiorino M, Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry.* 2010 Feb 9;49(5):835-42.
80. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Jul;38(7):995-1014.
81. Henderson LM, Chappel JB. NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Feb 15;1273(2):87-107.
82. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):245-313.
83. Ђорђевић ВБ, Павловић ДД, Коцић ГМ (2000). Карактеристике слободних радикала. У: Ђорђевић ВБ, Павловић ДД и Коцић ГМ (едитори). Биохемија слободних радикала. Београд: Технофарм доо; стр. 7-69.

84. Rhee SG. Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science*. 2006 Jun 30;312(5782):1882-3.
85. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015 Jun 5;97:55-74.
86. Alvarez B, Radi R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids*. 2003 Dec;25(3-4):295-311.
87. Schmidlin CJ, Dodson MB, Madhavan L, Zhang DD. Redox regulation by NRF2 in aging and disease. *Free Radic Biol Med*. 2019 Apr;134:702-707.
88. Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol*. 2018 Apr;14:450-464.
89. Ionescu-Tucker A, Cotman CW. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2021 Nov;107:86-95.
90. Tamagno E, Guglielmotto M, Vasciaveo V, Tabaton M. Oxidative Stress and Beta Amyloid in Alzheimer's Disease. Which Comes First: The Chicken or the Egg? *Antioxidants (Basel)*. 2021 Sep 16;10(9):1479.
91. Jovanović Z, Jovanović S. Otpornost nervnih ćelija na oksidativna oštećenja. *Med Pregl* 2011;64(7-8):386-91.
92. Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci*. 2010 Mar 30;2:12.
93. Praticò D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci*. 2001 Jun 15;21(12):4183-7.
94. Su B, Wang X, Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Perry G, Smith MA, Zhu X. Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2008 Dec;5(6):525-32.
95. Mondragón-Rodríguez S, Basurto-Islas G, Lee HG, Perry G, Zhu X, Castellani RJ, Smith MA. Causes versus effects: the increasing complexities of Alzheimer's disease pathogenesis. *Expert Rev Neurother*. 2010 May;10(5):683-91.
96. Kolin A, Brill NQ and Broberg PJ. Stimulation of irritable tissues by means of an alternating magnetic field. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1959 Oct;102:251-3.
97. Bickford RG and Fremming BD. Neural stimulation by pulsed magnetic fields in animals and man. *6th Int Conf Med Electr Biol Eng*. Tokyo. Abstract 7-6. 1965.
98. Polson MJ, Barker AT, Freeston IL. Stimulation of nerve trunks with time-varying magnetic fields. *Med Biol Eng Comput*. 1982 Mar;20(2):243-4.
99. Barker AT, Jalinous R, Freeston IL. Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. *Lancet*. 1985 May 11;1(8437):1106-7.

100. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 1973 Jul;232(2):331-56.
101. Uzair M, Abualait T, Arshad M, Yoo WK, Mir A, Bunyan RF, Bashir S. Transcranial magnetic stimulation in animal models of neurodegeneration. *Neural Regen Res.* 2022 Feb;17(2):251-265.
102. Ilić NV. Efekat kombinovane primene neinvazivne kortikalne stimulacije i motornog treninga na hronični motorni deficit ruke nakon moždanog udara. Универзитет у Београду. 2017 Jul 10.
103. Mančić B. Uticaj repetitivne transkranijalne magnetne stimulacije na ekspresiju neurotrofičnog faktora moždanog porekla, transportere za glutamat i oksidativno stanje u selektivno osetljivim moždanim strukturama pacova. Универзитет одбране. 2020 Dec 14.
104. Wassermann EM. Risk and safety of repetitive transcranial magnetic stimulation: report and suggested guidelines from the International Workshop on the Safety of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation, June 5-7, 1996. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1998 Jan;108(1):1-16.
105. Hallett M. Transcranial magnetic stimulation: a primer. *Neuron.* 2007 Jul 19;55(2):187-99.
106. Roth BJ, Basser PJ. A model of the stimulation of a nerve fiber by electromagnetic induction. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1990 Jun;37(6):588-97.
107. Edwards MJ, Talelli P, Rothwell JC. Clinical applications of transcranial magnetic stimulation in patients with movement disorders. *Lancet Neurol.* 2008 Sep;7(9):827-40.
108. Makowiecki K, Harvey AR, Sherrard RM, Rodger J. Low-intensity repetitive transcranial magnetic stimulation improves abnormal visual cortical circuit topography and upregulates BDNF in mice. *J Neurosci.* 2014 Aug 6;34(32):10780-92.
109. Shirota Y, Sommer M, Paulus W. Strength-Duration Relationship in Paired-pulse Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) and Its Implications for Repetitive TMS. *Brain Stimul.* 2016 Sep-Oct;9(5):755-761.
110. Ueno S, Tashiro T and Harada K. Localized stimulation of neural tissue in the brain by means of a paired configuration of time-varying magnetic fields. *J Appl Phys.* **64**, 1988. 5862-5864.
111. León Ruiz M, Rodríguez Sarasa ML, Sanjuán Rodríguez L, Benito-León J, García-Albea Ristol E, Arce Arce S. Current evidence on transcranial magnetic stimulation and its potential usefulness in post-stroke neurorehabilitation: Opening new doors to the treatment of cerebrovascular disease. *Neurologia (Engl Ed).* 2018 Sep;33(7):459-472. English, Spanish.
112. Pascual-Leone A, Nguyet D, Cohen LG, Brasil-Neto JP, Cammarota A, Hallett M. Modulation of muscle responses evoked by transcranial magnetic stimulation during the acquisition of new fine motor skills. *J Neurophysiol.* 1995 Sep;74(3):1037-45.
113. Rossi S, Hallett M, Rossini PM, Pascual-Leone A; Safety of TMS Consensus Group. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clin Neurophysiol.* 2009 Dec;120(12):2008-2039.

114. Deng ZD, Lisanby SH, Peterchev AV. Electric field depth-focality tradeoff in transcranial magnetic stimulation: simulation comparison of 50 coil designs. *Brain Stimul.* 2013 Jan;6(1):1-13.
115. Rastogi A, Cash R, Dunlop K, Vesia M, Kucyi A, Ghahremani A, Downar J, Chen J, Chen R. Modulation of cognitive cerebello-cerebral functional connectivity by lateral cerebellar continuous theta burst stimulation. *Neuroimage.* 2017 Sep;158:48-57.
116. Horvath JC, Mathews J, Demitrack MA, Pascual-Leone A. The NeuroStar TMS device: conducting the FDA approved protocol for treatment of depression. *J Vis Exp.* 2010 Nov 12;(45):2345.
117. Chen R, Classen J, Gerloff C, Celnik P, Wassermann EM, Hallett M, Cohen LG. Depression of motor cortex excitability by low-frequency transcranial magnetic stimulation. *Neurology.* 1997 May;48(5):1398-403.
118. Huang YZ, Chen RS, Rothwell JC, Wen HY. The after-effect of human theta burst stimulation is NMDA receptor dependent. *Clin Neurophysiol.* 2007 May;118(5):1028-32.
119. Hoogendam JM, Ramakers GM, Di Lazzaro V. Physiology of repetitive transcranial magnetic stimulation of the human brain. *Brain Stimul.* 2010 Apr;3(2):95-118.
120. Pabst A, Proksch S, Médé B, Comstock DC, Ross JM, Balasubramaniam R. A systematic review and meta-analysis of the efficacy of intermittent theta burst stimulation (iTBS) on cognitive enhancement. *Neurosci Biobehav Rev.* 2022 Apr;135:104587.
121. Huang YZ, Edwards MJ, Rounis E, Bhatia KP, Rothwell JC. Theta burst stimulation of the human motor cortex. *Neuron.* 2005 Jan 20;45(2):201-6.
122. Chung SW, Rogasch NC, Hoy KE, Sullivan CM, Cash RFH, Fitzgerald PB. Impact of different intensities of intermittent theta burst stimulation on the cortical properties during TMS-EEG and working memory performance. *Hum Brain Mapp.* 2018 Feb;39(2):783-802.
123. Koponen LM, Stenroos M, Nieminen JO, Jokivarsi K, Gröhn O, Ilmoniemi RJ. Individual head models for estimating the TMS-induced electric field in rat brain. *Sci Rep.* 2020 Oct 15;10(1):17397.
124. Boonzaier J, Petrov PI, Otte WM, Smirnov N, Neggers SFW, Dijkhuizen RM. Design and Evaluation of a Rodent-Specific Transcranial Magnetic Stimulation Coil: An In Silico and In Vivo Validation Study. *Neuromodulation.* 2020 Apr;23(3):324-334.
125. Wilson MT, Tang AD, Iyer K, McKee H, Waas J, Rodger J. The challenges of producing effective small coils for transcranial magnetic stimulation of mice. *Biomedical Physics & Engineering Express.* 2018 Apr 10;4(3):037002.
126. Cho SS, Strafella AP. rTMS of the left dorsolateral prefrontal cortex modulates dopamine release in the ipsilateral anterior cingulate cortex and orbitofrontal cortex. *PLoS One.* 2009 Aug 21;4(8):e6725.
127. Kanno M, Matsumoto M, Togashi H, Yoshioka M, Mano Y. Effects of acute repetitive transcranial magnetic stimulation on dopamine release in the rat dorsolateral striatum. *J Neurol Sci.* 2004 Jan 15;217(1):73-81.

128. Choung JS, Kim JM, Ko MH, Cho DS, Kim M. Therapeutic efficacy of repetitive transcranial magnetic stimulation in an animal model of Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 2021 Jan 11;11(1):437.
129. Chou YH, Ton That V, Sundman M. A systematic review and meta-analysis of rTMS effects on cognitive enhancement in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2020 Feb;86:1-10.
130. Chi H, Chang HY, Sang TK. Neuronal Cell Death Mechanisms in Major Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2018 Oct 9;19(10):3082.
131. Pemberton JM, Pogmore JP, Andrews DW. Neuronal cell life, death, and axonal degeneration as regulated by the BCL-2 family proteins. *Cell Death Differ.* 2021 Jan;28(1):108-122.
132. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.* 2018 Jan;25(1):65-80.
133. Müller MB, Toschi N, Kresse AE, Post A, Keck ME. Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expression of brain-derived neurotrophic factor and cholecystokinin mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific areas of rat brain. *Neuropsychopharmacology.* 2000 Aug 1;23(2):205-15.
134. Ogiue-Ikeda M, Kawato S, Ueno S. Acquisition of ischemic tolerance by repetitive transcranial magnetic stimulation in the rat hippocampus. *Brain Res.* 2005 Mar 10;1037(1-2):7-11.
135. Guo F, Lou J, Han X, Deng Y, Huang X. Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Ameliorates Cognitive Impairment by Enhancing Neurogenesis and Suppressing Apoptosis in the Hippocampus in Rats with Ischemic Stroke. *Front Physiol.* 2017 Aug 2;8:559.
136. Bashir S, Uzair M, Abualait T, Arshad M, Khallaf RA, Niaz A, Thani Z, Yoo WK, Túnez I, Demirtas-Tatlidede A, Meo SA. Effects of transcranial magnetic stimulation on neurobiological changes in Alzheimer's disease (Review). *Mol Med Rep.* 2022 Apr;25(4):109.
137. Weiler M, Stieger KC, Long JM, Rapp PR. Transcranial Magnetic Stimulation in Alzheimer's Disease: Are We Ready? *eNeuro.* 2020 Jan 7;7(1):ENEURO.0235-19.2019.
138. Miranda M, Morici JF, Zanoni MB, Bekinschtein P. Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. *Front Cell Neurosci.* 2019 Aug 7;13:363.
139. Wang ZH, Xiang J, Liu X, Yu SP, Manfredsson FP, Sandoval IM, Wu S, Wang JZ, Ye K. Deficiency in BDNF/TrkB Neurotrophic Activity Stimulates  $\delta$ -Secretase by Upregulating C/EBP $\beta$  in Alzheimer's Disease. *Cell Rep.* 2019 Jul 16;28(3):655-669.e5.
140. Ng TKS, Ho CSH, Tam WWS, Kua EH, Ho RC. Decreased Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Levels in Patients with Alzheimer's Disease (AD): A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci.* 2019 Jan 10;20(2):257.
141. Wang HY, Crupi D, Liu J, Stucky A, Cruciata G, Di Rocco A, Friedman E, Quartarone A, Ghilardi MF. Repetitive transcranial magnetic stimulation enhances BDNF-TrkB signaling in both brain and lymphocyte. *J Neurosci.* 2011 Jul 27;31(30):11044-54.

142. Zuo C, Cao H, Ding F, Zhao J, Huang Y, Li G, Huang S, Jiang H, Jiang Y, Wang F. Neuroprotective efficacy of different levels of high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation in mice with CUMS-induced depression: Involvement of the p11/BDNF/Homer1a signaling pathway. *J Psychiatr Res.* 2020 Jun;125:152-163.
143. Schaller G, Sperling W, Richter-Schmidinger T, Mühle C, Heberlein A, Maihöfner C, Kornhuber J, Lenz B. Serial repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) decreases BDNF serum levels in healthy male volunteers. *J Neural Transm (Vienna).* 2014;121(3):307-13.
144. Medina-Fernández FJ, Escribano BM, Padilla-Del-Campo C, Drucker-Colín R, Pascual-Leone Á, Túnez I. Transcranial magnetic stimulation as an antioxidant. *Free Radic Res.* 2018 Apr;52(4):381-389.
145. Velioglu HA, Hanoglu L, Bayraktaroglu Z, Toprak G, Guler EM, Bektay MY, Mutlu-Burnaz O, Yulug B. Left lateral parietal rTMS improves cognition and modulates resting brain connectivity in patients with Alzheimer's disease: Possible role of BDNF and oxidative stress. *Neurobiol Learn Mem.* 2021 Apr;180:107410.
146. Jäkel S, Dimou L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Front Cell Neurosci.* 2017 Feb 13;11:24.
147. Cullen CL, Young KM. How Does Transcranial Magnetic Stimulation Influence Glial Cells in the Central Nervous System? *Front Neural Circuits.* 2016 Apr 5;10:26.
148. Ferreira SA, Pinto N, Serrenho I, Pato MV, Baltazar G. Contribution of glial cells to the neuroprotective effects triggered by repetitive magnetic stimulation: a systematic review. *Neural Regen Res.* 2024 Jan;19(1):116-123.
149. Medina-Fernández FJ, Luque E, Aguilar-Luque M, Agüera E, Feijóo M, García-Maceira FI, Escribano BM, Pascual-Leone Á, Drucker-Colín R, Túnez I. Transcranial magnetic stimulation modifies astrogliosis, cell density and lipopolysaccharide levels in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Life Sci.* 2017 Jan 15;169:20-26.
150. Al-Ghraiyyah NF, Wang J, Alkhalifa AE, Roberts AB, Raj R, Yang E, Kaddoumi A. Glial Cell-Mediated Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 12;23(18):10572.
151. Vlachos A, Müller-Dahlhaus F, Roskopp J, Lenz M, Ziemann U, Deller T. Repetitive magnetic stimulation induces functional and structural plasticity of excitatory postsynapses in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci.* 2012 Nov 28;32(48):17514-23.
152. Volz LJ, Benali A, Mix A, Neubacher U, Funke K. Dose-dependence of changes in cortical protein expression induced with repeated transcranial magnetic theta-burst stimulation in the rat. *Brain Stimul.* 2013 Jul;6(4):598-606.
153. Young KM, Mitsumori T, Pringle N, Grist M, Kessaris N, Richardson WD. An Fgfr3-iCreER(T2) transgenic mouse line for studies of neural stem cells and astrocytes. *Glia.* 2010 Jun;58(8):943-53.
154. Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci.* 2012 May 2;32(18):6391-410.

155. Zhao SC, Ma LS, Chu ZH, Xu H, Wu WQ, Liu F. Regulation of microglial activation in stroke. *Acta Pharmacol Sin.* 2017 Apr;38(4):445-458.
156. Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener.* 2020 Nov 26;9(1):42.
157. Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 2018 Oct;21(10):1359-1369.
158. Kim JY, Choi GS, Cho YW, Cho H, Hwang SJ, Ahn SH. Attenuation of spinal cord injury-induced astroglial and microglial activation by repetitive transcranial magnetic stimulation in rats. *J Korean Med Sci.* 2013 Feb;28(2):295-9.
159. G. Paxinos and C. Watson, *The rat brain, in stereotaxic coordinates.* Academic Press, 1997.
160. Mehla J, Pahuja M, Gupta YK. Streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease: selection of appropriate dose. *J Alzheimers Dis.* 2013;33(1):17-21.
161. Ghosh R, Sil S, Gupta P, Ghosh T. Optimization of intracerebroventricular streptozotocin dose for the induction of neuroinflammation and memory impairments in rats. *Metab Brain Dis.* 2020 Dec;35(8):1279-1286
162. Moreira-Silva D, Vizin RCL, Martins TMS, Ferreira TL, Almeida MC, Carrettiero DC. Intracerebral Injection of Streptozotocin to Model Alzheimer Disease in Rats. *Bio Protoc.* 2019 Oct 20;9(20):e3397.
163. Vicente MC, Humphrey CM, Gargaglioni LH, Ostrowski TD. Decreased excitability of locus coeruleus neurons during hypercapnia is exaggerated in the streptozotocin-model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 2020 Jun;328:113250.
164. Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 1994 Apr;11(2):187-96.
165. Foyet HS, Keugong Wado E, Ngatanko Abaïssou HH, Assongalem EA, Eyong OK. Anticholinesterase and Antioxidant Potential of Hydromethanolic Extract of *Ziziphus mucronata* (Rhamnaceae) Leaves on Scopolamine-Induced Memory and Cognitive Dysfunctions in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2019 Oct 24;2019:4568401.
166. De Luca SN, Ziko I, Sominsky L, Nguyen JC, Dinan T, Miller AA, Jenkins TA, Spencer SJ. Early life overfeeding impairs spatial memory performance by reducing microglial sensitivity to learning. *J Neuroinflammation.* 2016 May 18;13(1):112.
167. Richter SH, Zeuch B, Lankisch K, Gass P, Durstewitz D, Vollmayr B. Where have I been? Where should I go? Spatial working memory on a radial arm maze in a rat model of depression. *PLoS One.* 2013 Apr 22;8(4):e62458.
168. Stone WS, Rudd RJ, Parsons MW, Gold PE. Memory scores in middle-aged rats predict later deficits in memory, paradoxical sleep, and blood glucose regulation in old age. *Exp Aging Res.* 1997 Jul-Sep;23(3):287-300.



169. Hritcu L, Cioanca O, Hancianu M. Effects of lavender oil inhalation on improving scopolamine-induced spatial memory impairment in laboratory rats. *Phytomedicine*. 2012 Apr 15;19(6):529-34.
170. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem*. 1978 Jun 15;87(1):206-10.
171. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Green wald RA, editor. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, 3th ed. Florida: CRC Press. 1985. p. 123-32.
172. Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem*. 1978 Oct 1;90(1):81-9.
173. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*. 1991 Feb 15;196(2-3):143-51.
174. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 1959. 82(1):70-7.
175. Alekseichuk I, Mantell K, Shirinpour S, Opitz A. Comparative modeling of transcranial magnetic and electric stimulation in mouse, monkey, and human. *Neuroimage*. 2019 Jul 1;194:136-148.
176. Rostami F, Javan M, Moghimi A, Haddad-Mashadrizeh A, Fereidoni M. Streptozotocin-induced hippocampal astrogliosis and insulin signaling malfunction as experimental scales for subclinical sporadic Alzheimer model. *Life Sci*. 2017 Nov 1;188:172-185.
177. Zhang H, Wang D, Gong P, Lin A, Zhang Y, Ye RD, Yu Y. Formyl Peptide Receptor 2 Deficiency Improves Cognition and Attenuates Tau Hyperphosphorylation and Astrogliosis in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2019;67(1):169-179.
178. Murtishaw AS, Heaney CF, Bolton MM, Sabbagh JJ, Langhardt MA, Kinney JW. Effect of acute lipopolysaccharide-induced inflammation in intracerebroventricular-streptozotocin injected rats. *Neuropharmacology*. 2016 Feb;101:110-22.
179. Andrade MK, Souza LC, Azevedo EM, Bail EL, Zanata SM, Andreatini R, Vital MABF. Melatonin reduces  $\beta$ -amyloid accumulation and improves short-term memory in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease model. *IBRO Neurosci Rep*. 2023 Jan 26;14:264-272.
180. Luo H, Xiang Y, Qu X, Liu H, Liu C, Li G, Han L, Qin X. Apelin-13 Suppresses Neuroinflammation Against Cognitive Deficit in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Alzheimer's Disease Through Activation of BDNF-TrkB Signaling Pathway. *Front Pharmacol*. 2019 Apr 16;10:395.
181. Nyberg L, Eriksson J. Working Memory: Maintenance, Updating, and the Realization of Intentions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Dec 4;8(2):a021816.
182. Evangelista ND, O'Shea A, Kraft JN, Hausman HK, Boutzoukas EM, Nissim NR, Albizu A, Hardcastle C, Van Etten EJ, Bharadwaj PK, Smith SG, Song H, Hishaw GA, DeKosky S, Wu S, Porges E, Alexander GE, Marsiske M, Cohen R, Woods AJ. Independent Contributions of Dorsolateral Prefrontal Structure and Function to Working Memory in Healthy Older Adults. *Cereb Cortex*. 2021 Feb 5;31(3):1732-1743.

183. Wu Q, Xu X, Zhai C, Zhao Z, Dai W, Wang T, Shen Y. High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation improves spatial episodic learning and memory performance by regulating brain plasticity in healthy rats. *Front Neurosci.* 2022 Aug 5;16:974940.
184. Holczer A, Nemeth VL, Vekony T, Vecsei L, Klivenyi P, Must A. Non-invasive brain stimulation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment-a state-of-the-art review on methodological characteristics and stimulation parameters. *Front Hum Neurosci.* 2020;14:179.
185. Ahmed MA, Darwish ES, Khedr EM, El Serogy YM, Ali AM. Effects of low versus high frequencies of repetitive transcranial magnetic stimulation on cognitive function and cortical excitability in Alzheimer's dementia. *J Neurol.* 2012 Jan;259(1):83-92.
186. Wu X, Ji GJ, Geng Z, Wang L, Yan Y, Wu Y, Xiao G, Gao L, Wei Q, Zhou S, Wei L, Tian Y, Wang K. Accelerated intermittent theta-burst stimulation broadly ameliorates symptoms and cognition in Alzheimer's disease: A randomized controlled trial. *Brain Stimul.* 2022 Jan-Feb;15(1):35-45.
187. Kim SK, Lee GY, Kim SK, Kwon YJ, Seo EB, Lee H, Lee SH, Kim SJ, Lee S, Ye SK. Protective Effects of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Against Streptozotocin-Induced Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* 2023 Sep 27.
188. Stekic A, Zeljkovic M, Zaric Kontic M, Mihajlovic K, Adzic M, Stevanovic I, Ninkovic M, Grkovic I, Ilic TV, Nedeljkovic N, Dragic M. Intermittent Theta Burst Stimulation Ameliorates Cognitive Deficit and Attenuates Neuroinflammation via PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in Alzheimer's-Like Disease Model. *Front Aging Neurosci.* 2022 May 17;14:889983.
189. Lin Y, Jin J, Lv R, Luo Y, Dai W, Li W, Tang Y, Wang Y, Ye X, Lin WJ. Repetitive transcranial magnetic stimulation increases the brain's drainage efficiency in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2021 Jun 2;9(1):102.
190. Wang Y, Liu J, Hui Y, Wu Z, Wang L, Wu X, Bai Y, Zhang Q, Li L. Dose and time-dependence of acute intermittent theta-burst stimulation on hippocampus-dependent memory in parkinsonian rats. *Front Neurosci.* 2023 Feb 14;17:1124819.
191. Luo J, Zheng H, Zhang L, Zhang Q, Li L, Pei Z, Hu X. High-Frequency Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) Improves Functional Recovery by Enhancing Neurogenesis and Activating BDNF/TrkB Signaling in Ischemic Rats. *Int J Mol Sci.* 2017 Feb 20;18(2):455.
192. Havrankova J, Brownstein M, Roth J. Insulin and insulin receptors in rodent brain. *Diabetologia.* 1981 Mar;20(Suppl 1):268-273.
193. Cherubini E. and Miles R. The CA3 region of the hippocampus: How is it? What is it for? How does it do it?. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 9, no. FEB. Frontiers Research Foundation, Feb. 05, 2015.
194. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1957 Feb;20(1):11-21.
195. O'Keefe J. and Nadel L., *The hippocampus as a cognitive map.* Clarendon Press, 1978.

196. Sirwi A, El Sayed NS, Abdallah HM, Ibrahim SRM, Mohamed GA, El-Halawany AM, Safo MK, Abdel Rasheed NO. Umuhengerin Neuroprotective Effects in Streptozotocin-Induced Alzheimer's Disease Mouse Model via Targeting Nrf2 and NF- $\kappa$ B Signaling Cascades. *Antioxidants* (Basel). 2021 Dec 18;10(12):2011.
197. Lee HW, Yang SH, Kim JY, Kim H. The Role of the Medial Habenula Cholinergic System in Addiction and Emotion-Associated Behaviors. *Front Psychiatry*. 2019 Feb 28;10:100.
198. Hemonnot AL, Hua J, Ulmann L, and Hirbec H, "Microglia in Alzheimer disease: Well-known targets and new opportunities," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 9, no. JUL. Frontiers Media S.A., 2019.
199. Farfara D, Lifshitz V, Frenkel D. Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*. 2008 Jun;12(3):762-80.
200. Femminella GD, Dani M, Wood M, Fan Z, Calsolaro V, Atkinson R, Edginton T, Hinz R, Brooks DJ, Edison P. Microglial activation in early Alzheimer trajectory is associated with higher gray matter volume. *Neurology*. 2019 Mar 19;92(12):e1331-e1343.
201. Fan Z, Brooks DJ, Okello A, Edison P. An early and late peak in microglial activation in Alzheimer's disease trajectory. *Brain*. 2017 Mar 1;140(3):792-803.
202. Lu Y, Dong Y, Tucker D, Wang R, Ahmed ME, Brann D, Zhang Q. Treadmill Exercise Exerts Neuroprotection and Regulates Microglial Polarization and Oxidative Stress in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;56(4):1469-1484.
203. Lin LF, Jhao YT, Chiu CH, Sun LH, Chou TK, Shiue CY, Cheng CY, Ma KH. Bezafibrate Exerts Neuroprotective Effects in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals* (Basel). 2022 Jan 18;15(2):109.
204. Yang W, Liu Y, Xu QQ, Xian YF, Lin ZX. Sulforaphene Ameliorates Neuroinflammation and Hyperphosphorylated Tau Protein via Regulating the PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  Pathway in Experimental Models of Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Sep 10;2020:4754195.
205. Kawabori M, Yenari MA. The role of the microglia in acute CNS injury. *Metab Brain Dis*. 2015 Apr;30(2):381-92.
206. Ferrini F, De Koninck Y. Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling. *Neural Plast*. 2013;2013:429815.
207. Huang L, Jin J, Chen K, You S, Zhang H, Sideris A, Norcini M, Recio-Pinto E, Wang J, Gan WB, Yang G. BDNF produced by cerebral microglia promotes cortical plasticity and pain hypersensitivity after peripheral nerve injury. *PLoS Biol*. 2021 Jul 22;19(7):e3001337.
208. Dragic M, Zeljkovic M, Stevanovic I, Ilic T, Ilic N, Nedeljkovic N, Ninkovic M. Theta burst stimulation ameliorates symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis and attenuates reactive gliosis. *Brain Res Bull*. 2020 Sep;162:208-217.
209. Dragić M, Zeljković M, Stevanović I, Adžić M, Stekić A, Mihajlović K, Grković I, Ilić N, Ilić TV, Nedeljković N, Ninković M. Downregulation of CD73/A<sub>2A</sub>R-Mediated Adenosine Signaling as a Potential Mechanism of Neuroprotective Effects of Theta-Burst Transcranial Magnetic

Stimulation in Acute Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Brain Sci.* 2021 Jun 1;11(6):736.

210. Vorhees CV, Williams MT. Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR J.* 2014;55(2):310-32.

211. Zappa Villar MF, López Hanotte J, Falomir Lockhart E, Trípodí LS, Morel GR, Reggiani PC. Intracerebroventricular streptozotocin induces impaired Barnes maze spatial memory and reduces astrocyte branching in the CA1 and CA3 hippocampal regions. *J Neural Transm (Vienna).* 2018 Dec;125(12):1787-1803.

212. Dragić M, Zarić M, Mitrović N, Nedeljković N, Grković I. Two Distinct Hippocampal Astrocyte Morphotypes Reveal Subfield-Different Fate during Neurodegeneration Induced by Trimethyltin Intoxication. *Neuroscience.* 2019 Dec 15;423:38-54.

213. Liu Z, Kumar M, Kabra A. Cucurbitacin B exerts neuroprotection in a murine Alzheimer's disease model by modulating oxidative stress, inflammation, and neurotransmitter levels. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2022 Feb 17;27(2):71.

214. Pathan AR, Viswanad B, Sonkusare SK, Ramarao P. Chronic administration of pioglitazone attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. *Life Sci.* 2006 Nov 2;79(23):2209-16.

215. Saxena G, Patro IK, Nath C. ICV STZ induced impairment in memory and neuronal mitochondrial function: A protective role of nicotinic receptor. *Behav Brain Res.* 2011 Oct 10;224(1):50-7.

216. Alluri R, Ambati SR, Routhu K, Kopalli SR, Koppula S. Phosphoinositide 3-kinase inhibitor AS605240 ameliorates streptozotocin-induced Alzheimer's disease like sporadic dementia in experimental rats. *EXCLI J.* 2020 Jan 6;19:71-85.

217. Akhtar A, Dhaliwal J, Sah SP. 7,8-Dihydroxyflavone improves cognitive functions in ICV-STZ rat model of sporadic Alzheimer's disease by reversing oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *Psychopharmacology (Berl).* 2021 Jul;238(7):1991-2009.

218. Chausse B, Lewen A, Poschet G, Kann O. Selective inhibition of mitochondrial respiratory complexes controls the transition of microglia into a neurotoxic phenotype in situ. *Brain Behav Immun.* 2020 Aug;88:802-814.

219. Butterfield DA, Boyd-Kimball D. Mitochondrial Oxidative and Nitrosative Stress and Alzheimer Disease. *Antioxidants (Basel).* 2020 Sep 2;9(9):818.

220. Guo C, Sun L, Chen X, Zhang D. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.* 2013 Jul 25;8(21):2003-14.

221. Wang F, Yuan Q, Chen F, Pang J, Pan C, Xu F, Chen Y. Fundamental Mechanisms of the Cell Death Caused by Nitrosative Stress. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Sep 20;9:742483.

222. Stevanovic I, Ninkovic M, Mancic B, Milivojevic M, Stojanovic I, Ilic T, Vujovic M, Djukic M. Compensatory Neuroprotective Response of Thioredoxin Reductase against Oxidative-Nitrosative Stress Induced by Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Rats: Modulation by Theta Burst Stimulation. *Molecules.* 2020 Aug 27;25(17):3922.

223. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.
224. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jan 15;482(3):419-425.
225. Montine TJ, Neely MD, Quinn JF, Beal MF, Markesbery WR, Roberts LJ, Morrow JD. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 2002 Sep 1;33(5):620-6.
226. Anoush M, Bijani S, Moslemifar F, Jahanpour F, Kalantari-Hesari A, Hosseini MJ. Edaravone Improves Streptozotocin-Induced Memory Impairment via Alleviation of Behavioral Dysfunction, Oxidative Stress, Inflammation, and Histopathological Parameters. *Behav Neurol*. 2023 Jul 12;2023:9652513.
227. Farbood, Y., Sarkaki, A., Mahdavinia, M., Ghadiri, A., Teimoori, A., Seif, F., et al. (2020). Protective Effects of Co- administration of Zinc and Selenium Against Streptozotocin-Induced Alzheimer's Disease: Behavioral, Mitochondrial Oxidative Stress, and GPR39 Expression Alterations in Rats. *Neurotox Res* 38, 398–407.
228. Bell SM, Barnes K, De Marco M, Shaw PJ, Ferraiuolo L, Blackburn DJ, Venneri A, Mortiboys H. Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease: A Biomarker of the Future? *Biomedicines*. 2021 Jan 11;9(1):63.
229. Huang TT, Leu D, Zou Y. Oxidative stress and redox regulation on hippocampal-dependent cognitive functions. *Arch Biochem Biophys*. 2015 Jun 15;576:2-7.
230. Dannhardt G, Kohl BK. The glycine site on the NMDA receptor: structure-activity relationships and possible therapeutic applications. *Curr Med Chem*. 1998 Aug;5(4):253-63.
231. Lovell MA, Xie C, Markesbery WR. Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures. *Neurobiol Aging*. 2001 Mar-Apr;22(2):187-94.
232. Santos RX, Correia SC, Zhu X, Lee HG, Petersen RB, Nunomura A, Smith MA, Perry G, Moreira PI. Nuclear and mitochondrial DNA oxidation in Alzheimer's disease. *Free Radic Res*. 2012 Apr;46(4):565-76.
233. Bavarsad K, Hadjzadeh MA, Hosseini M, Pakdel R, Beheshti F, Bafadam S, Ashaari Z. Effects of levothyroxine on learning and memory deficits in a rat model of Alzheimer's disease: the role of BDNF and oxidative stress. *Drug Chem Toxicol*. 2020 Jan;43(1):57-63.
234. Tiwari V, Mishra A, Singh S, Mishra SK, Sahu KK, Parul, Kulkarni MJ, Shukla R, Shukla S. Protriptyline improves spatial memory and reduces oxidative damage by regulating NFκB-BDNF/CREB signaling axis in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Brain Res*. 2021 Mar 1;1754:147261.
235. Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2018 May-Jun;12(3):88-93
236. Sun L, Dou X, Yang W. Propofol protects rats against intra-cerebroventricular streptozotocin-induced cognitive dysfunction and neuronal damage. *Folia Morphol (Warsz)*. 2023;82(2):248-255.

237. Squadrito GL, Pryor WA. The nature of reactive species in systems that produce peroxy nitrite. *Chem Res Toxicol*. 1998 Jul;11(7):718-9.
238. Panjamurthy K, Manoharan S, Ramachandran CR. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cell Mol Biol Lett*. 2005;10(2):255-64.
239. Sofic E, Salkovic-Petrisic M, Tahirovic I, Sapcanin A, Mandel S, Youdim M, Riederer P. Brain catalase in the streptozotocin-rat model of sporadic Alzheimer's disease treated with the iron chelator-monoamine oxidase inhibitor, M30. *J Neural Transm (Vienna)*. 2015 Apr;122(4):559-64.
240. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Nov 11;2019:9613090.
241. Mattson MP, Lovell MA, Furukawa K, Markesbery WR. Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J Neurochem*. 1995 Oct;65(4):1740-51.
242. Habib LK, Lee MT, Yang J. Inhibitors of catalase-amyloid interactions protect cells from beta-amyloid-induced oxidative stress and toxicity. *J Biol Chem*. 2010 Dec 10;285(50):38933-43.
243. Wang Y, Fang K, He S, Fan Y, Yu J, Zhang X. Effects of repetitive magnetic stimulation on the growth of primarily cultured hippocampus neurons in vitro and their expression of iron-containing enzymes. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2019 Apr 11;15:927-934.
244. Zaleska MM, Nagy K, Floyd RA. Iron-induced lipid peroxidation and inhibition of dopamine synthesis in striatum synaptosomes. *Neurochem Res*. 1989 Jul;14(7):597-605.
245. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 2009 Feb-Apr;30(1-2):1-12.
246. Tota S, Awasthi H, Kamat PK, Nath C, Hanif K. Protective effect of quercetin against intracerebral streptozotocin induced reduction in cerebral blood flow and impairment of memory in mice. *Behav Brain Res*. 2010 May 1;209(1):73-9.
247. Papadopoulos MC, Koumenis IL, Dugan LL, Giffard RG. Vulnerability to glucose deprivation injury correlates with glutathione levels in astrocytes. *Brain Res*. 1997 Feb 14;748(1-2):151-6.
248. García-Giménez JL, Markovic J, Dasí F, Queval G, Schnaubelt D, Foyer CH, Pallardó FV. Nuclear glutathione. *Biochim Biophys Acta*. 2013 May;1830(5):3304-16.
249. Chatterjee A. Reduced glutathione: a radioprotector or a modulator of DNA-repair activity? *Nutrients*. 2013 Feb 7;5(2):525-42.
250. Naghizadeh B, Mansouri MT, Ghorbanzadeh B. Protective effects of crocin against streptozotocin-induced oxidative damage in rat striatum. *Acta Med Iran*. 2014;52(2):101-5.
251. Ulrich K, Jakob U. The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radic Biol Med*. 2019 Aug 20;140:14-27.
252. Cuadrado A, Rojo AI, Wells G, Hayes JD, Cousin SP, Rumsey WL, Attucks OC, Franklin S, Levonen AL, Kensler TW, Dinkova-Kostova AT. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Apr;18(4):295-317.

253. Davies DA, Adlimoghaddam A, Albeni BC. Role of Nrf2 in Synaptic Plasticity and Memory in Alzheimer's Disease. *Cells*. 2021 Jul 25;10(8):1884.
254. Sharma V, Kaur A, Singh TG. Counteracting role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway in Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother*. 2020 Sep;129:110373.
255. Ke Q, Yang J, Liu H, Huang Z, Bu L, Jin D, Liu C. Dose- and time-effects responses of Nonylphenol on oxidative stress in rat through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2021 Apr 6;216:112185.
256. Liang H, Xu C, Hu S, Wen G, Lin J, Liu T, Xu J. Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Improves Neuropathy and Oxidative Stress Levels in Rats with Experimental Cerebral Infarction through the Nrf2 Signaling Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2021 Sep 6;2021:3908677.
257. Nakhate KT, Bharne AP, Verma VS, Aru DN, Kokare DM. Plumbagin ameliorates memory dysfunction in streptozotocin induced Alzheimer's disease via activation of Nrf2/ARE pathway and inhibition of  $\beta$ -secretase. *Biomed Pharmacother*. 2018 May;101:379-390.
258. Túnez I, Drucker-Colín R, Jimena I, Medina FJ, Muñoz Mdel C, Peña J, Montilla P. Transcranial magnetic stimulation attenuates cell loss and oxidative damage in the striatum induced in the 3-nitropropionic model of Huntington's disease. *J Neurochem*. 2006 May;97(3):619-30.
259. Tasset I, Drucker-Colín R, Peña J, Jimena I, Montilla P, Medina FJ, Túnez I. Antioxidant-like effects and protective action of transcranial magnetic stimulation in depression caused by olfactory bulbectomy. *Neurochem Res*. 2010 Aug;35(8):1182-7.
260. Abed DA, Goldstein M, Albanyan H, Jin H, Hu L. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents. *Acta Pharm Sin B*. 2015 Jul;5(4):285-99.
261. Bruna B, Lobos P, Herrera-Molina R, Hidalgo C, Paula-Lima A, Adasme T. The signaling pathways underlying BDNF-induced Nrf2 hippocampal nuclear translocation involve ROS, RyR-Mediated  $Ca^{2+}$  signals, ERK and PI3K. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Oct 20;505(1):201-207.
267. Stevanovic I, Mancic B, Ilic T, Milosavljevic P, Lavrnja I, Stojanovic I, Ninkovic M. Theta burst stimulation influence the expression of BDNF in the spinal cord on the experimental autoimmune encephalomyelitis. *Folia Neuropathol*. 2019;57(2):129-145.
268. Numakawa T, Odaka H, Adachi N. Actions of Brain-Derived Neurotrophin Factor in the Neurogenesis and Neuronal Function, and Its Involvement in the Pathophysiology of Brain Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 19;19(11):3650.
269. Singh NK, Garabadu D. Quercetin Exhibits  $\alpha$ 7nAChR/Nrf2/HO-1-Mediated Neuroprotection Against STZ-Induced Mitochondrial Toxicity and Cognitive Impairments in Experimental Rodents. *Neurotox Res*. 2021 Dec;39(6):1859-1879.
270. Murphy TH, Yu J, Ng R, Johnson DA, Shen H, Honey CR, Johnson JA. Preferential expression of antioxidant response element mediated gene expression in astrocytes. *J Neurochem*. 2001 Mar;76(6):1670-8.

271. Haskew-Layton RE, Payappilly JB, Smirnova NA, Ma TC, Chan KK, Murphy TH, Guo H, Langley B, Sultana R, Butterfield DA, Santagata S, Alldred MJ, Gazaryan IG, Bell GW, Ginsberg SD, Ratan RR. Controlled enzymatic production of astrocytic hydrogen peroxide protects neurons from oxidative stress via an Nrf2-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 5;107(40):17385-90.
272. Tamam Y, Yokuş B, Tamam C, Yüceer H, Karahan S, Em B, Tamam ŞB, Tüzün E. The Effect of Lidocaine on the Experimental Model of Streptozotocin-Induced Alzheimer's Disease. *Noro Psikiyatrs Ars*. 2023 Feb 18;60(1):68-72.
273. Pierzynowska K, Podlacha M, Gaffke L, Majkutewicz I, Mantej J, Węgrzyn A, Osiadły M, Myślińska D, Węgrzyn G. Autophagy-dependent mechanism of genistein-mediated elimination of behavioral and biochemical defects in the rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 2019 Apr;148:332-346.
274. Retinasamy T, Shaikh MF, Kumari Y, Abidin SAZ, Othman I. *Orthosiphon stamineus* Standardized Extract Reverses Streptozotocin-induced Alzheimer's Disease-Like Condition in a Rat Model. *Biomedicines*. 2020 Apr 30;8(5):104.
275. Souza LC, Andrade MK, Azevedo EM, Ramos DC, Bail EL, Vital MABF. Andrographolide Attenuates Short-Term Spatial and Recognition Memory Impairment and Neuroinflammation Induced by a Streptozotocin Rat Model of Alzheimer's Disease. *Neurotox Res*. 2022 Oct;40(5):1440-1454.
276. Gupta S, Yadav K, Mantri SS, Singhal NK, Ganesh S, Sandhir R. Evidence for Compromised Insulin Signaling and Neuronal Vulnerability in Experimental Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*. 2018 Dec;55(12):8916-8935.
277. Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*. 2011 Jan 7;4:3.
278. Plummer S, Van den Heuvel C, Thornton E, Corrigan F, Cappai R. The Neuroprotective Properties of the Amyloid Precursor Protein Following Traumatic Brain Injury. *Aging Dis*. 2016 Mar 15;7(2):163-79.
279. Mishra SK, Singh S, Shukla S, Shukla R. Intracerebroventricular streptozotocin impairs adult neurogenesis and cognitive functions via regulating neuroinflammation and insulin signaling in adult rats. *Neurochem Int*. 2018 Feb;113:56-68.
280. Wang Z, Jackson RJ, Hong W, Taylor WM, Corbett GT, Moreno A, Liu W, Li S, Frosch MP, Slutsky I, Young-Pearse TL, Spires-Jones TL, Walsh DM. Human Brain-Derived A $\beta$  Oligomers Bind to Synapses and Disrupt Synaptic Activity in a Manner That Requires APP. *J Neurosci*. 2017 Dec 6;37(49):11947-11966.
281. Sasaguri H, Nilsson P, Hashimoto S, Nagata K, Saito T, De Strooper B, Hardy J, Vassar R, Winblad B, Saido TC. APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J*. 2017 Sep 1;36(17):2473-2487.
282. Jung Y, Whitwell JL, Duffy JR, Strand EA, Machulda MM, Senjem ML, Jack CR, Lowe VJ, Josephs KA. Regional  $\beta$ -amyloid burden does not correlate with cognitive or language deficits in Alzheimer's disease presenting as aphasia. *Eur J Neurol*. 2016 Feb;23(2):313-9.



283. Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D. Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron*. 2009 Jun 25;62(6):788-801.
284. Butterfield DA, Boyd-Kimball D. Oxidative Stress, Amyloid- $\beta$  Peptide, and Altered Key Molecular Pathways in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2018;62(3):1345-1367.
285. Yang T, Li S, Xu H, Walsh DM, Selkoe DJ. Large Soluble Oligomers of Amyloid  $\beta$ -Protein from Alzheimer Brain Are Far Less Neuroactive Than the Smaller Oligomers to Which They Dissociate. *J Neurosci*. 2017 Jan 4;37(1):152-163.
286. Reed T, Perluigi M, Sultana R, Pierce WM, Klein JB, Turner DM, Coccia R, Markesbery WR, Butterfield DA. Redox proteomic identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified brain proteins in amnesic mild cognitive impairment: insight into the role of lipid peroxidation in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2008 Apr;30(1):107-20.
287. Zhang H, Jiang X, Ma L, Wei W, Li Z, Chang S, Wen J, Sun J, Li H. Role of A $\beta$  in Alzheimer's-related synaptic dysfunction. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Aug 26;10:964075.
288. Frost GR, Li YM. The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. *Open Biol*. 2017 Dec;7(12):170228.
289. Leuba G, Wernli G, Vernay A, Kraftsik R, Mohajeri MH, Saini KD. Neuronal and nonneuronal quantitative BACE immunocytochemical expression in the entorhinohippocampal and frontal regions in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2005;19(4):171-83.
290. Hendrickx A, Pierrot N, Tasiaux B, Schakman O, Brion JP, Kienlen-Campard P, De Smet C, Octave JN. Epigenetic induction of EGR-1 expression by the amyloid precursor protein during exposure to novelty. *PLoS One*. 2013 Sep 16;8(9):e74305.
291. Qin X, Wang Y, Paudel HK. Inhibition of Early Growth Response 1 in the Hippocampus Alleviates Neuropathology and Improves Cognition in an Alzheimer Model with Plaques and Tangles. *Am J Pathol*. 2017 Aug;187(8):1828-1847.
292. He L, Liu X, Li H, Dong R, Liang R, Wang R. *Polyrhachis vicina* Roger Alleviates Memory Impairment in a Rat Model of Alzheimer's Disease Through the EGR1/BACE1/APP Axis. *ACS Chem Neurosci*. 2022 Jul 6;13(13):1857-1867.
293. Duclot F, Kabbaj M. The Role of Early Growth Response 1 (EGR1) in Brain Plasticity and Neuropsychiatric Disorders. *Front Behav Neurosci*. 2017 Mar 6;11:35.
294. Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol*. 2018 Apr;38(3):579-593.
295. Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J*. 1990 Aug;9(8):2459-64.
296. Hock C, Heese K, Hulette C, Rosenberg C, Otten U. Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch Neurol*. 2000 Jun;57(6):846-51.

297. Peng S, Wu J, Mufson EJ, Fahnstock M. Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2005 Jun;93(6):1412-21.
298. Borba EM, Duarte JA, Bristot G, Scotton E, Camozzato AL, Chaves ML. Brain-Derived Neurotrophic Factor Serum Levels and Hippocampal Volume in Mild Cognitive Impairment and Dementia due to Alzheimer Disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra.* 2016 Dec 9;6(3):559-567.
299. Song JH, Yu JT, Tan L. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Alzheimer's Disease: Risk, Mechanisms, and Therapy. *Mol Neurobiol.* 2015 Dec;52(3):1477-1493.
300. Chen Z, Zhong C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull.* 2014 Apr;30(2):271-81.
301. Rosa E, Fahnstock M. CREB expression mediates amyloid  $\beta$ -induced basal BDNF downregulation. *Neurobiol Aging.* 2015 Aug;36(8):2406-13.
302. Poon WW, Blurton-Jones M, Tu CH, Feinberg LM, Chabrier MA, Harris JW, Jeon NL, Cotman CW.  $\beta$ -Amyloid impairs axonal BDNF retrograde trafficking. *Neurobiol Aging.* 2011 May;32(5):821-33.
303. Wang DC, Chen SS, Lee YC, Chen TJ. Amyloid-beta at sublethal level impairs BDNF-induced arc expression in cortical neurons. *Neurosci Lett.* 2006 May 1;398(1-2):78-82.
304. Francis BM, Yang J, Hajderi E, Brown ME, Michalski B, McLaurin J, Fahnstock M, Mount HT. Reduced tissue levels of noradrenaline are associated with behavioral phenotypes of the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology.* 2012 Jul;37(8):1934-44.
305. Parihar MS, Brewer GJ. Amyloid- $\beta$  as a modulator of synaptic plasticity. *J Alzheimers Dis.* 2010;22(3):741-63.
306. Lee CW, Wu HF, Chu MC, Chung YJ, Mao WC, Li CT, Lin HC. Mechanism of Intermittent Theta-Burst Stimulation in Synaptic Pathology in the Prefrontal Cortex in an Antidepressant-Resistant Depression Rat Model. *Cereb Cortex.* 2021 Jan 1;31(1):575-590.
307. Soundara Rajan T, Ghilardi MFM, Wang HY, Mazzon E, Bramanti P, Restivo D, Quartarone A. Mechanism of Action for rTMS: A Working Hypothesis Based on Animal Studies. *Front Physiol.* 2017 Jun 30;8:457.
308. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron.* 2004 Sep 30;44(1):5-21.
309. Zuccato C, Cattaneo E. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol.* 2009 Jun;5(6):311-22.
310. Bading H. Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. *Nat Rev Neurosci.* 2013 Sep;14(9):593-608.
311. Zhao H, Alam A, San CY, Eguchi S, Chen Q, Lian Q, Ma D. Molecular mechanisms of brain-derived neurotrophic factor in neuro-protection: Recent developments. *Brain Res.* 2017 Jun 15;1665:1-21.

312. Chen W, Mahadomrongkul V, Berger UV, Bassan M, DeSilva T, Tanaka K, Irwin N, Aoki C, Rosenberg PA. The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons. *J Neurosci*. 2004 Feb 4;24(5):1136-48.
313. Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*. 1997 Jun 13;276(5319):1699-702.
314. Arnth-Jensen N, Jabaudon D, Scanziani M. Cooperation between independent hippocampal synapses is controlled by glutamate uptake. *Nat Neurosci*. 2002 Apr;5(4):325-31.
315. Tsvetkov E, Shin RM, Bolshakov VY. Glutamate uptake determines pathway specificity of long-term potentiation in the neural circuitry of fear conditioning. *Neuron*. 2004 Jan 8;41(1):139-51.
316. Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 2004 Oct;45(5):583-95.
317. Mattson MP. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med*. 2003;3(2):65-94.
318. Wood OWG, Yeung JHY, Faull RLM, Kwakowsky A. EAAT2 as a therapeutic research target in Alzheimer's disease: A systematic review. *Front Neurosci*. 2022 Aug 10;16:952096
319. Mookherjee P, Green PS, Watson GS, Marques MA, Tanaka K, Meeker KD, Meabon JS, Li N, Zhu P, Olson VG, Cook DG. GLT-1 loss accelerates cognitive deficit onset in an Alzheimer's disease animal model. *J Alzheimers Dis*. 2011;26(3):447-55.
320. Scimemi A, Meabon JS, Woltjer RL, Sullivan JM, Diamond JS, Cook DG. Amyloid- $\beta$ 1-42 slows clearance of synaptically released glutamate by mislocalizing astrocytic GLT-1. *J Neurosci*. 2013 Mar 20;33(12):5312-8.
321. Li S, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Masliah E. Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997 Aug;56(8):901-11.
322. Gu QB, Zhao JX, Fei J, Schwarz W. Modulation of Na(+),K(+) pumping and neurotransmitter uptake by beta-amyloid. *Neuroscience*. 2004;126(1):61-7.
323. Danysz W, Parsons CG. Alzheimer's disease,  $\beta$ -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine--searching for the connections. *Br J Pharmacol*. 2012 Sep;167(2):324-52.
324. Sulkowski G, Wencel PL, Dąbrowska-Bouta B, Struzynska L, Strosznajder R. Alterations in the transcriptional profile of genes related to glutamatergic signalling in animal models of Alzheimer's disease. The effect of fingolimod. *Folia Neuropathol*. 2022;60(1):10-23.
325. Beckstrøm H, Julsrud L, Haugeto O, Dewar D, Graham DI, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. Interindividual differences in the levels of the glutamate transporters GLAST and GLT, but no clear correlation with Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 1999 Jan 15;55(2):218-29.

326. Garcia-Esparcia P, Diaz-Lucena D, Ainciburu M, Torrejón-Escribano B, Carmona M, Llorens F, Ferrer I. Glutamate Transporter GLT1 Expression in Alzheimer Disease and Dementia With Lewy Bodies. *Front Aging Neurosci.* 2018 Apr 26;10:122.
327. Yeung JHY, Palpagama TH, Wood OWG, Turner C, Waldvogel HJ, Faull RLM, Kwakowsky A. EAAT2 Expression in the Hippocampus, Subiculum, Entorhinal Cortex and Superior Temporal Gyrus in Alzheimer's Disease. *Front Cell Neurosci.* 2021 Sep 13;15:702824.
328. Mantic B, Stevanovic I, Ilic TV, Djuric A, Stojanovic I, Milanovic S, Ninkovic M. Transcranial theta-burst stimulation alters GLT-1 and vGluT1 expression in rat cerebellar cortex. *Neurochem Int.* 2016 Nov;100:120-127.
329. Rimmele TS, Rosenberg PA. GLT-1: The elusive presynaptic glutamate transporter. *Neurochem Int.* 2016 Sep;98:19-28.

## IX БИОГРАФИЈА АУТОРА

Мастер биолог Јелена Станојевић је рођена у Чачку 18.08.1989. Дипломирала је на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу, модул Мастер биолог, 2013. године са просечном оценом 9,35. Докторске академске студије биомедицине, модул неуронауке, уписала је 2017. године на Медицинском факултету Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду.

Публиковане референце из теме доктората које су биле услов за одбрану тезе:

*Stanojevic J, Zeljkovic M, Dragic M, Stojanovic I, Ilic T, Stevanovic I, Ninkovic M. Intermittent theta burst stimulation attenuates oxidative stress and reactive astrogliosis in the streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease-like pathology. Front Aging Neurosci. 2023 18;15:1161678.*