



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Никола Сладојевић

УТИЦАЈ МАЛИХ ДОЗА СПИРОНОЛАКТОНА НА  
ИНФЛАМАТОРНИ ОДГОВОР ПРОУЗРОКОВАН  
РЕПЕРФУЗИЈОМ МОЖДАНОГ ТКИВА У  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МИШЈЕМ МОДЕЛУ ИСХЕМИЧНОГ  
МОЖДАНОГ УДАРА

Докторска дисертација

Крагујевац, 2013.

- *Изражавам најтоплију захвалност и поштовање свом ментору Проф. др. Анушки Анђелковић-Zochowska на свему што је учинила за мене и моју породицу током мог рада у њеној лабораторији као и на несебичној помоћи и сугестијама у изради ове тезе.*
- *Велику захвалност изражавам својој пријатељици и стручној сарадници др. Светлани Стаматовић на неизмерној помоћи и подршци коју ми је пружила у животу, раду и изради ове тезе.*
- *Дубоко се захваљујем и поштованом председнику комисије Проф. др. Драгану Миловановићу на помоћи и сугестијама током израде ове тезе.*
- *Искрено се захваљујем и поштованим члановима комисије Проф. др Гордани Тончев и Проф. др Александру Рашковић.*
- *Велику захвалност дугујем својој породици која ме је са много љубави и разумевања подржавала у свему што радим а посебно супрузи Јовани и сину Дамјану којима је све ово и намењено.*

## Садржај

### *1. Увод*

- 1.1 Дефиниција
- 1.2. Класификација
- 1.3. Транзиторни исхемијски атак (ТИА)
- 1.4. Епидемиологија možданог удара
- 1.5. Фактори ризика
- 1.6. Патопфизиологија акутног исхемијског možданог удара
- 1.7. Клиничка симптоматологија
- 1.8. Лечење акутног исхемијског možданог удара

### *2. Циљеви и хипотезе*

- 2.1 Циљеви
- 2.2 Хипотезе

### *3. Материјал и методе*

- 3.1 Ћелијска линија
- 3.2. Лабораториске животиње
- 3.3. Експерименталне групе
- 3.4. Експериментални модели možданог удара
  - 3.4.1. Кисеонично-глукозна депривација
  - 3.4.2. Оклузија средње možдане артерије
- 3.5. Детекција информационах рибонуклеинских киселина (иРНК)
- 3.6. Имуноблотинг протеина (Western blot)
- 3.7. Имунофлуоресцентно бојење и конфокална микроскопија
- 3.8. Одређивање активираниог NFκB P65 комплекса
- 3.9. Одређивање експресије инфламаторних цитокина
- 3.10. Одређивање количине течности у мозгу мерењем мокро-суве тежине
- 3.11. Мерење величине инфаркта мозга тетразолиум методом
- 3.12. Мерење трансендотелијалне електричне резистенце (ТЕЕР)

### 3.13. Одређивање неуролошког статуса животиња

## 4. Резултати

4.1. Антиинфламаторно дејство спиронолактона на Bend.3 мишје ендотелне ћелије мозга након исхемично реперфузионог оштећења.

4.1.1. Дејство спиронолактона на генску експресију код Bend.3 мишјих ендотелних ћелије мозга након исхемично реперфузионог оштећења.

4.1.2. Антиинфламаторно дејство спиронолактона на протеинску експресију код Bend.3 мишјих ендотелних ћелије мозга након исхемично реперфузионог оштећења

4.1.3 Утицај спиронолактона на промену трансендотелне резистенце код Bend.3 мишјих ендотелних ћелије мозга након исхемично реперфузионог оштећења

4.2. Антиинфламаторно дејство спиронолактона на исхемично реперфузионо оштећење мозга код C5BL6 мишева

4.2.1. Дејство спиронолактона на синтезу инфламаторних медијатора код исхемично реперфузионог оштећења мозга C5BL6 мишева.

4.2.2. Утицај спиронолактона на величину инфаркта мозга након *in vivo* модела možданог удара код C5BL6 мишева.

4.2.3. Утицај спиронолактона на пропустљивост крвно-мождане баријере код исхемично реперфузионог оштећења мозга C5BL6 мишева

4.2.4. Процена утицаја третмана спиронолактона на неуролошко оштећење код C5BL6 мишева након исхемије-реперфузије

4.2.5. Утицај спиронолактона на дужину преживљавања C5BL6 мишева након исхемично-реперфузионог оштећења мозга

4.3. Антиинфламаторно дејство спиронолактона посредствано је стабилизацијом NFκB транскрипционог фактора

4.3.1. Одређивање активираниог NFκB транскрипционог фактора

4.3.2. Утицај спиронолактона на стабилизацију IκBα-NFκB комплекса

4.3.3. Утицај спиронолактона на релокализацију NFκB комплекса у једро код Bend.3 ћелија након исхемије-реперфузије.

## 5. Дискусија

5.1. Експериментални модели у možданом удару

5.2. Спиринолактон као поотенцијална антиинфламаторна терапија за реперфузијоно оштећење

5.2.1. Утицај спинолактона на инфламаторни одговор мозга код исхемије-реперфузије

5.2.2. Утицај спинолактона на тежину неуролошког оштећења након експерименталног модела исхемичног можданог удара

5.2.3. Молекуларни механизам антиинфламаторног дејства спинолактона на исхемично реперфузијоно оштећење.

6. Закључак

7. Референце

*Индекс Слика*

*Слика 1.* Култура bEnd.3 ћелија обележена флуоресцентним CD31 (PECAM-1) антителиом.

*Слика 2.* Шематски приказ мишјег модела исхемичног можданог удара интралуминалном оклузијом средње мождане артерије.

*Слика 3.* Интралуминална сатура (DocolCorporation 6021PK5Re).

*Слика 4.* Шематски приказ одређивања активираниог NFκB рађено је коришћењем комерцијалног кита (TransAM® NFκB P65 Kit, Active Motif ,USA).

*Слика 5.* Шематски приказ одређивања експресије инфламаторних цитокина комерцијалним китом RayBio Mouse Citokine Antibody Array 3.

*Слика 6.* Метода мерења трансендотелне резистенце конфлуентних ендотелних ћелија помоћу трансендотелног волтметра EVOM2, World Preecision Instruments, Inc.

*Слика 7.* Семиквантитативно одређивање експресије информационе РНК за цитокине А) CXCL5, Б) IL6 ,В) MCP-1, Г) IL1-β, Д) TNFα и адхезионог молекула Ђ) ICAM-1 помоћу end point RT-PCR методе.

*Слика 8.* Семиквантитативно одређивање експресије информационе РНК за синтетазе азотних оксида А) iNOS Б) eNOS помоћу end point RT-PCR методе.

Слика 9. Анализа 62 различита цитокина, адхезионих молекула и хемокина помоћу кита RayBio Mouse Citokine Antibody Array 3.

Слика 10. Western blot анализа након *in vitro* експеримената А) адхезиони молекул ICAM-1, Б) азотни оксид синтетаза за iNOS.

Слика 11. Мерење трансендотелне резистенце конфлуентних Bend.3 ћелија предходно изложених кисеонично глукозној депривацији са или без третмана 5 $\mu$ M спиронолактоном.

Слика 12. Анализа 62 различита цитокина, адхезионих молекула и хемокина је помоћу кита RayBio Mouse Citokine Antibody Array 3 у *in vivo* експериментима.

Слика 13. Western blot анализа након *in vivo* експеримената А) азотни оксид синтетаза iNOS, Б) азотни оксид синтетаза eNOS В) адхезиони молекул ICAM-1.

Слика 14. Одређивање величине инфаркта мозга након транзијентне исхемије средње мождане артерије код C5BL6 мишева методом TTC бојења пресека ткива код MCAO и MCAO+Спиро група животиња.

Слика 15. Садржај воде у ткиву мозга мерен мокро сувом методом мерења тежине ткива.

Слика 16. Процена неуролошког статуса C5BL6 мишева након исхемије-реперфузије.

Слика 17. Kaplan-Meier крива преживљавања C5BL6 мишева десет дана након изазване исхемије-реперфузије мозга.

Слика 18. Одређивање активираниог NF $\kappa$ B код Bend.3 ћелија сат времена након реперфузије (TransAM<sup>®</sup> NF $\kappa$ B P65 Kit).

Слика 19. Western blot анализа А) I $\kappa$ B $\alpha$  и Б) p-I $\kappa$ B $\alpha$ .

Слика 20. Имунофлуоресцентно бојење NF $\kappa$ B комплекса код Bend.3 ендотелних ћелија сат времена након реперфузије.

Табела 1. Приказ 62 различита цитокина одређиваних помоћу комерцијалног кита RayBio Mouse Citokine Antibody Array 3.

*Табела 2.* Одређивање неуролошког статуса експерименталних животиња након модела исхемичног možданог удара.



## 1. Увод

### 1.1 Дефиниција

Акутни мождани удар (АМУ) представља фокални или глобални поремећај мождане функције, који настаје нагло, траје дуже од 60 минута, а последица је поремећаја мождане циркулације у коме проток крви није довољан да задовољи метаболичке потребе ткива (1,2).

### 1.2. Класификација

У зависности од механизма настанка акутни мождани удар се може класификовати у две групе:

- *Акутни исхемијски мождани удар (АИМУ)* – настаје као последица оклузије крвног суда тромбо-емболусом.
- *Акутни хеморагични мождани удар* - настао као последица крварења у мозгу. По пореклу крварења може се поделити на интрацеребрални (ИЦХ) и субарехноидални (САХ) хеморагични мождани удар.

Акутни исхемијски мождани удар знатно је чешћи и јавља се у 80% случајева, док се хеморагични мождани удар јавља код 20% болесника (1,2).

### 1.3. Транзиторни исхемијски атак (ТИА)

Посебну групу заузима транзиторни исхемијски атак дефинисан као нагло настали неуролошки дефицит у трајању до 60 минута проузрокован исхемијом појединих делова мозга. Узроци настанка овог поремећаја су хиперперфузија и микроемболија. ТИА не доводи до трајног оштећења можданог ткива већ се ради о транзијентном поремећају неуролошких функција. Праћен је симптомима сличним исхемијском можданом удару, с тим да се комплетно повлаче у року од 24. Транзиторни исхемијски атак не треба занемаривати пошто се ради о једном од најозбиљнијих упозорења за могући настанак можданог удара.

Многобројне студије су показале да након два дана од ТИА 5% људи доживи мождани удар, док се у року од три месеца тај број пење и до 15% новооболелих (1,2).

#### 1.4. Епидемиологија можданог удара

Мождани удар представља трећи узрок смртности у развијеним земљама, након кардиоваскуларних и малигних болести и главни узрок трајног инвалидитета у свету.

На основу података добијених из неколико великих центара у Србији мождани удар представља први узрок смртности код жена (18% жена и 12% мушкараца) и други узрок смртности код мушкараца а такође и први узрок смртности у хоспиталним условима. Инциденца варира у разним земљама и креће се од 100-500 нових случајева на 100000 становника годишње. У Србији се сматра да је инциденца три пута већа у односу на Западну Европу и износи око 300 нових случајева на 100000 становника годишње. На основу ових података долазимо до броја од 25000 новооболелих особа сваке године у Србији. Инциденца овог обољења се удвостручава на сваких 10 година после 55. године живота. Сваки четврти новооболели је млађи од 40 година. Од пацијената који преживе АМУ, 13% мушкараца и 22% жена година између 40 и 69 поново доживе мождани удар у року од 5 година док ће поновни мождани удар у року од 5 година доживети 23% мушкараца и 28% жена старости преко 70 година (3).

У последњој деценији број новооболелих у Србији нарастао је за 100% док је у развијеним земљама опао за 42% (4).

У Сједињеним Америчким Државама 700000 људи доживи мождани удар сваке године, односно сваких 45 секунди неко доживи мождани удар, док сваких 3 до 4 минута неко умре од последица можданог удара.

Преваленца АМУ се креће од 600 оболелих на 100000 становника у развијеним земљама па до 900 у неразвијеним земљама.

Морталитет варира од 65 до 250 смртних случајева сваке године на 100000 становника. Највећи степен смртности је у првих три месеца и износи скоро 30%.

Поред високе стопе морталитета мождани удар представља водећи узрок трајног инвалидитета у свету. Након можданог удара приближно 30% људи се опорави и врати запослењу, 30% настављају да живе са трајним инвалидитетом који захтева помоћ другог лица а 30% умре.

На основу свега наведеног АМУ представља један од водећих социоекономских проблема данашњег друштва. Лечење, нега и рехабилитација сваког оболелог кошта и преко 200000 долара што Сједињене Америчке Државе кошта 62.7 милијарди долара годишње (3,5).

Због свих ових суморних статистичких података данас се велика пажња полаже на превенцију фактора ризика, њихово лечење и добру организацију мреже јединица за мождани удар.

### 1.5. Фактори ризика

Факторе ризика за развој акутног исхемијског можданог удара можемо поделити на факторе на које се може утицати и на факторе на које се не може утицати.

*Фактори ризика на које се не може утицати:*

- *Пол*- особе мушког пола чешће оболевају али је већа смртност забележена код жена.
- *Старост*- ризик за АИМУ расте са старосћу и дуплира се у свакој декади живота после 55 године.
- *Раса*- црна раса има готово дупло већу учесталост од осталих раса.
- *Хередитет*- позитивна породична анамнеза повећава ризик за развој АИМУ.

*Фактори ризика на које се може утицати:*

- *Хипертензија*- особе са хипертензијом имају три пута већи ризик за АИМУ.
- *Дијабетес*- инциденца АИМУ је два пута већа код дијабетичара док је исход и тежина самог обољења знатно лошија.
- *Пушење*- коришћење цигарета и других дуванских производа доводи до два пута већег ризика за развој АИМУ од људи који немају навику коришћења ових производа.
- *Кардиолошки поремећаји*- фибрилација предкомора представља веома важан ризик фактор и сматра се одговорном за 50% АИМУ. Остали ризик фактори кардиолошког порекла су: пролапс митралне валвуле, ендокардитиси, дилатативна кардиомиопатија, вештачке валвуле, интракардијални урођени дефекти као и акутни инфаркт миокарда.
- *Абнормалности серумских липида*- повећање триглицерида, холестерола, LDL-а и смањење HDL повећавају ризик за развој АИМУ.
- *Гојазност*- индекс телесне масе већи од 30 kg/m<sup>2</sup> предиспонира развој АИМУ.
- *Физичка активност*- умерена физичка активност делује протективно на развој АИМУ.
- *Злоупотреба алкохола*- ефекти употребе алкохола су контраверзни и вероватно да зависе од дозе. Сматра се да мале дозе делују протективно док су алкохоличари у великом ризику за АИМУ.
- *Начин исхране*- сматра се да исхрана богата воћем и поврћем смањује ризик за

АИМУ.

- *Супституциона терапија хормонима и контрацепција*- су повезане са већим ризиком за развој овог обољења (1,2).

#### 1.6. Патопфизиологија акутног исхемијског možданог удара

Мозак за разлику од других органа као супстрат за производњу енергије користи једино глукозу. Пошто мозак нема могућности за складиштење енергије, директно зависи од константног протока крви и снабдевања глукозом и кисеоником. Метаболичке потребе мозга су велике и за нормално функционисање користи 20% укупног кисеоника тела и ако чини само 2% телесне масе. Потребне мозга за кисеоником су много веће код деце, поготову у првој декади живота и укупно износе и до 50% укупног кисеоника тела. За задовољавање нормалних потреба мозга неопходан је церебрални проток крви од 800 ml/минути што износи око 20% срчаног минутног волумена. Нормални церебрални проток крви износи 50-100 ml/100g/минути. Исхемија ткива настаје код пада протока крви између 12-20 ml/100g/минути када компензаторни механизми покушавају да одрже минимални капацитет снабдевања глукозом и кисеоником. При овом паду крвног протока настаје фаза „електричне тишине” односно престанак електричне активности неурона. При оваквом смањењу перфузије ткива, уколико не траје дуго настају реверзибилне промена ћелија ткива. Са даљим падом перфузије испод 12 ml/100g/минути настају ирреверзибилне промене неурона са последичном инфаркцијом ткива.

Смањење протока крви и допремање кисеоника и глукозе у ткиву мозга покреће читав низ молекуларних промена у ћелијама ткива мозга. Сви ови молекуларни механизми као последица исхемије даље воде ка јаком инфламаторном одговору ткива.

Промене које настају у ћелијама ткива у условима исхемије су пад и немогућност производње високоенергетских молекула АТФ-а, немогућност одржавања јонске хомеостазе, ацидоза, повећање количине интраћелијског калцијума, ослобађање глутамата, накупљање производа арахидоничне киселине, синтезе слободних радикала, активација система комплемента, накупљање активираних периферних леукоцита, активација микроглије и астроцита, синтеза адхезионих молекула од стране ендотелних ћелија мозга и синтеза инфламаторних медијатора. Сви ови процеси заједно и координисано доводе до развоја едема и исхемичне некрозе. У региону ткива захваћеног апсолутном редуцијом крви настаје некроза, док у региону око њега, који

се назива пенубра, долази до реверзибилног поремећаја функције ћелија, уколико се узрок поремећаја функције одклони у року од неколико сати. Заправо сви терапијски напори усмерени су на зону пенубре у покушају да се након одклањања узрока исхемије да адекватна антиинфламаторна и неуропротективна терапија како би се предупредиле негативне конвенсе реперфузије и повратила нормална функција ћелија.

Након само неколико минута од оклузије крвног суда долази до пада концентрације глукозе и кисеоника са последичним падом рН ткива због нагомилавања киселих продуката метаболизма. Пад рН доводи до поремећаја електронског транспорта у митохондријама и наглог смањења концентрације АТФ-а. Немогућност одржања енергетске хомеостазе представља први поремећај у низу који следе након исхемије ткива мозга. Недостатак АТФ-а узрокује престанак функционисања енергетски зависних јонских пумпи као што су  $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -АТФ и  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{H}^+$ -АТФ. Афункционалношћу ових јонских пумпи настаје пораст интраћелијске концентрације  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  и пада концентрације  $\text{K}^+$  што доводи до повећања осмотског притиска и бубрења ћелија. Оваква прерасподела јона доводи и до активације протеаза, ендонуклеаза, киназа, липаза што даље води ћелију ка апоптози, деполаризацији неурона и ослобађања неуротрансмитера пре свега глутамата као главног ексцитаторног неуротрансмитера. Ослобађање глутамата доводи до даље егзитотоксичности ћелија. Главни механизам глутаматске токсичности јесте даље повећање интраћелијског калцијума и натријума активацијом глутаматских рецептора.

Продубљивање исхемије али и спонтана и терапијска реканализација крвног суда доводи до синтезе слободних радикала. Слободни радикали су високо реактивни молекули са једним или више неспарених електрона. Реакција ових молекула са DNA, протеинима и липидима доводи до њиховог оштећења и поремећаја ћелијске функције. Штетан ефекат слободних радикала се нормално отклања и редукује антиоксидативним механизмима ћелије, међутим у исхемији ови механизми су такође поремећени и њивова повећана продукција надмашује редукционе способности ћелје. Слободни радикали укључени у исхемично-реперфузионио оштећење мозга су кисеонични супероксид слободни радикал, водонични и азотни слободни радикали. Главни извор кисеоничних слободних радикала код исхемично-реперфузионог оштећења су митохондрије где долази до производње кисеоничног супероксида у току електронског транспорта. Други важан извор ове групе слободних радикала су неурони путем метаболизма арахидонске киселине циклооксигеназом и липооксигеназом. У

току инфламације ткива важан извор кисеоничних слободних радикала су активирана микроглија и периферни леукоцити путем NADPH оксидативног система. Азотни слободни радикали (NO) настају из L-аргинина помоћу неколико различитих NO синтетаза (NOS). Неурална NO синтетаза (nNOS) захтева калцијум-калмодулин за активацију и синтетизују је сами неурони. Индуцибилна NOS (iNOS) синтетизују инфламаторне ћелије крви (гранулоцити, моноцити и лимфоцити), активирана микроглија и ендотелне ћелије активиране исхемијом и реперфузијом ткива. Трећа форма NOS је ендотелна NOS (eNOS) која има повољан утицај након исхемије-реперфузије делујући вазодилаторно чиме помаже бољи доток крви након реперфузије. Такође eNOS утиче и вазодилаторно на колатералну циркулацију за време исхемије чиме се труди да одржи минималну перфузију ткива. Азотни оксиди слободно дифундују кроз мембране и у реакцији са супероксидом граде пероксинитрит (ONOO<sup>-</sup>), још један високо реактивни кисеонични слободни радикал. Слободни радикали као високореактивни молекули укључени су у низ процеса који за последицу имају ћелијску смрт и даљу пропацију инфламације.

Липидна пероксидација такође има важну улогу у оштећењу ткива код исхемије нагомилавањем алдехида 4-хидроксинонал (4-HNE) који ковалентно модификује мембранске транспортере као што су Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> АТФ, глукозне и глутаматне транспортере реметећи њихову функцију (6,7,8).

Постоји обиље доказа да спонтана или терапијска реканализација крвног суда доводи до настанка реперфузионог оштећења које се карактерисе јаким инфламаторним одговором ткива.

Неутрофили или полиморфонуклеарни леукоцити имају веома значајну улогу у реперфузионом оштећењу. Након реперфузије ткива долази до нагле акумулације и адхезије неутрофила у капиларима. Овај феномен доводи до реоклузије капилара и до поновног развоја исхемије. Овако настала реоклузија капилара се такође назива и по-reflow феномен. Поред поновне исхемије ткиво је изложено и додатном дејству акумулираних леукоцита. Активирани леукоцити доводе до додатног нарушавања интегритета крвно-мождане баријере, пролазе у ткиво и доводе до егзацербације оштећења. Активирани леукоцити у ткиву врше синтезу инфламаторних цитокина и слободних радикала. Највећа акумулација неутрофила је између 6 и 24 сати од реперфузије.

Моноцити и макрофази из крви прелазе у ткиво нешто касније за разлику од неутрофила. Највећа акумулација моноцита се среће након 24 часа и траје данима

након формирања инфаркта.

Микроглија из ткива мозга такође има значајну улогу у инфламацији. Активирана микроглија добија особине макрофага и може се детектовати у ткиву неколико сати од транзијентне ихемије. Слично као и крвни макрофази, активирана микроглија има пик 24 часа након реперфузије и перзистира данима у ткиву. Након инфилтрације крвних макрофага и активације микроглије ови фагоцити у ткиву продукују цитотоксичне факторе и продубљују реперфузионо оштећење.

Ендотелне ћелије мозга такође имају веома важну улогу у пропагацији инфламаторног одговора ткива након исхемије-реперфузије. Синтеза адхезионих молекула ендотелних ћелија представља круцијалан догађај неопходан за адхезију и миграцију периферних леукоцита у ткиво након чега долази до прелаза исхемичног у инфламаторни тип оштећења ткива. Интеракција између леукоцита и ендотелних ћелија посредована је трима главним групама адхезионих ћелијских молекула: селектини (P-selectin, E-selectin, L-selectin), имуноглобулин суперфамилијом адхезионих молекула (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1) и интегринима (CD11a-c). Повећана синтеза цитокина и хемокина од стране ендотелних ћелија доводи до даље пропагације имуног одговора и инфилтрације леукоцита. Најпроучаванији цитокини и хемокини код можданог удара су интерлеукин-1 (IL-1), туморнекрозис фактор алфа (TNF- $\alpha$ ), интерлеукин -6 (IL-6), интерлеукин-10, (IL-10), трансформишући фактор раста (TGF- $\beta$ ) и моноцитни хемоатрактински протеин-1 (MCP-1). Синтезу цитокина у мозгу поред инфилтрираних леукоцита из крви и ендотелних ћелија врше микроглија и астроцити.

Важна компонента пропагације имуног одговора је и синтеза матрикс металопроотеиназа (ММП). Матрикс металопроотеиназе су укључене у ремоделовање екстрацелуларног матрикса у склопу инфилтрације ткива инфламаторним ћелијама. Главни извор ММП поред активираних леукоцита су микроглија и астроцити.

Повећана секреција инфламаторних медијатора у стању исхемије-реперфузије ткива прати адекватна апрегулација гена за њихову синтезу. Транскрипција гена за инфламаторне медијаторе посредована је активацијом транскрипционих фактора. Најважнији транскрипциони фактор укључен у регулацији инфламаторног одговора ткива на исхемију-реперфузију је нуклеарни фактор  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B је димер састављен од субјединица Rel фамилије протеина коју чине пет различитих форми: Rel(cRel), RelA (p65), RelB, NF- $\kappa$ B1 (p50 и његовог прекурсора p105) NF- $\kappa$ B2 (p52 и његовог прекурсора p100). Најчешћа форма NF- $\kappa$ B је хетеродимер RelA (p65) и NF- $\kappa$ B1 (p50). NF- $\kappa$ B је нормално локализован у цитоплазми и везан за свој ендогени

инхибитор, познат као IκB протеин. IκB фамилију протеина чине IκBα, IκBβ, IκBγ и IκBε. Фосфорилацијом IκB на серину 32 и 36 помоћу IκB киназе (IKK) настаје фосфорилација, убиквитинизација и деградација 26s протеосома IκB протеина. Заједно ове промене доводе до распадања комплекса IκB-NF-κB и ослобађања NF-κB молекула. Слободни NF-κB прелази у једро где се везује за κB место на промотору за активацију транскрипције гена. Велики број гена укључених у инфламацију поседује функционални κB регион. Најзначајнији су гени за IL-1, TNF-α, IL-6, IL-10, MCP-1, ICAM-1, ICAM-2, COX2 и iNOS. Због свог значаја и улоге у пропагацији имуног одговора блокада транслокације транскрипционог фактора NF-κB представља логичну терапијску мету (9,10).

### *1.7. Клиничка симптоматологија*

Акутни исхемијски мождани удар се карактерише наглим почетком и брзим развојем неуролошких симптома. Већина пацијента је свесна почетка саме болести, међутим могућ је и поремећај стања свести на самом почетку поготово код великих хемисверних инфаркта и код инфаркта малог мозга. Главобољу има 25% пацијената док се мука и повраћање јављају претежно код инфаркта у задњој лобањској јами.

Главни неуролошки симптоми представљају једнострану губитак сензибилитета, хемипареза, плегија, просторни неглект, хомонимна хемианопсија, поремећај коњугованог погледа у страну жаришта, дизартрија, дисфагија, атаксија, нистагмус.

Веома је важно скоровање ових неуролошких симптома како би се пратио развој саме болести, доносиле одлуке о примени фибринолитичке терапије као и праћења ефеката лечења. У ову сврху се користи National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) док је за пацијента са поремећајем свести неопходно одредити Glasgow Coma Scale (1,2).

### *1.8. Лечење акутног исхемијског можданог удара*

Лечење акутног исхемијског можданог удара захтева ургентан приступ јер време представља најважнији фактор исхода лечења АИМУ. Гледано са терапијског аспекта



најдрагоценија су прва три сата од почетка симптома када примена фибринолитичке терапије даје најбоље ефекте. Период првих три сата се назива и „терапијски прозор“.

Хитан поступак у лечењу АИМУ се састоји из:

- a) Препознавање симптома и брзо тражење хитне медицинске помоћи.
- b) Брзи транспорт и прехоспитално испитивање.
- c) Прехоспиталне опште терапијске мере.
- d) Збрињавање пацијената у специјализованим јединицама за лечење можданог удара.

Као главна терапијска мера у јединицама за лечење можданог удара примењује се реканализација крвног суда интравенском применом рекомбинантног активатора плазминогена (rtPA) у дози од 0,9 mg/kg са 10% дозе у болусу а остало у IV инфузији током наредних 60 минута унутар 3 сата од почетка симптома (1,2).

Предности ове тераписке методе су потврђене у неколико великих студија: ATLANTIS, ECASS 2, ECASS 3 и NINDS. Главни недостаци ове методе су кратак терапијски прозор од само три сата, реперфузионо оштећење узроковано инфламацијом, едем и хеморагија. У основи свих компликација тромболитичке терапије налази се инфламација.

И поред тога што је велики број научника укључен на проналажењу адекватне антиинфламаторне и неуропротективне терапије за реперфузионо оштећење није начињен значајан корак у овој области.

У последње време све веће интересовање влада за дејство инхибитора минералокортикоидних рецептора на цереброваскуларне болести. Поред већ познатих терапијских ефеката код хипертензије, хипералдостеронизма и едематозних стања, њихов повољан утицај, доказан у неколико студија, отвара могућност за коришћење спиронолактона за смањење оштећења ткива након реперфузије крвног суда помоћу rtPA. У више различитих студија спиронолактон је показао антиинфламаторни и антифиброзни ефекат у терапији стања након инфаркта миокарда, акутне бубрежне инсуфицијенције, хипертензивне дијабетичне нефропатије као и код артритиса. Резултати двеју опсежних студија (EPHESUS, RALES) показали су да мале дозе спиронолактона значајно редукују морбидитет и морталитет код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом индукујући регресију хипертрофије леве срчане коморе, добру контролу крвног притиска и превенцију нових кардиоваскуларних оштећења. У експерименталним студијама показао се веома корисним у превенцији можданог удара код спонтано хипертензивних пацова као и смањење величине инфаркта мозга код мишева са идукованим можданим ударом. Недостатак минералокортикоидног

рецептора на макрофазима доводи до смањења постисхемичког инфламаторног одговора као и смањења величине инфаркта мозга након можданог удара (6,9,10).

Сви ови подаци дали су основу за постављање главне хипотезе ове студије, да повољан антиинфламаторни ефекат спиронолактона показан у досадашњим студијама могао бити веома користан код реперфузионог оштећења у експерименталним условима након мишјег исхемичног модела можданог удара.

## *2. Циљеви и хипотезе*

### *2.1 Циљеви*

- Испитати утицај спиронолактона на синтезу информационих РНК за синтезу инфламаторних медијатора у експерименталним групама након *in vitro* експеримената.
- Испитати утицај спиронолактона на синтезу инфламаторних медијатора у експерименталним групама након *in vitro* експеримената.
- Испитати утицај спиронолактона на трансендотелну резистенцију у експерименталним групама након *in vitro* експеримената.
- Испитати утицај спиронолактона на синтезу инфламаторних медијатора код експерименталних група животиња.
- Испитати утицај спиронолактона на величину инфаркта код МСАО+Спиро и МСАО групе мишева.
- Испитати утицај спиронолактона на пропустљивост крвно-мождане баријере у експерименталним групама.
- Испитати утицај спиронолактона на тежину неуролошког оштећења животиња након исхемичног možданог удара.
- Испитати утицај спиронолактона на преживљавање животиња након исхемичног možданог удара.
- Испитати дејство спиронолактона на стабилизацију NFκB транскрипционог фактора у експерименталним групама након *in vitro* експеримената.

## 2.1 *Xunomezе*

- Постоји значајно смањење синтезе информационе РНК за инфламаторне медијаторе у И/Р+Спиро групи у односу на И/Р групу ћелија.
- Смањена је синтеза инфламаторних медијатора у И/Р+Спиро групи у односу на И/Р групу ћелија.
- Постоји мањи пад трансендотелне резистенције у И/Р+Спиро групи у односу на И/Р групу ћелија.
- Третман спиронолактоном на почетку реперфузије доводи је до смањења синтезе инфламаторних медијатора код МСАО+Спиро групе мишева у односу на МСАО групу животиња.
- Величина инфаркта је мања код МСАО+Спиро групе животиња у односу на

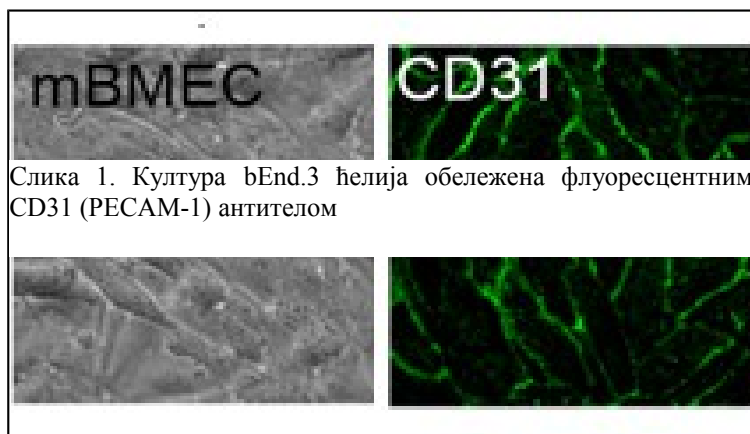
МСаО групу.

- Примена спиронолактона доводи до смањења пропустљивости крвно мождане баријере након мишјег модела исхемичног можданог удара.
- Неуролошко оштећење након мишјег модела исхемичног можданог удара је знатно блаже код животиња третираних спиронолактоном након реперфузије.
- Преживљавање након мишјег модела исхемичног можданог удара је знатно веће код животиња третираних спиронолактоном након реперфузије.
- Антиинфламаторно дејство спиронолактона посредовано је стабилизацијом NFκB транскрипционог фактора након *in vitro* модела исхемично реперфузионог оштећења.

### *3. Материјал и методе*

#### *3.1 Телијска линија*

Експерименти су изведени *in vitro* на *bEnd.3* ћелијама. *bEnd.3* ћелије су ендотелне ћелије миша, пореклом из мозга, инфициране NTKmT ретровирусом који је послужио као преносник polioma virus middle T (mT) онкогена. Ова ћелијска линија је комерцијално набављена од произвођача American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Према препоруци произвођача, ћелије су одржаване у инкубатору на 37 °C, при концентрацији CO<sub>2</sub> од 10% (v/v) у Dulbecco's Modified Eagle медијуму (DMEM; Invitrogen Corporation, NY, U.S.A.) са 10% серума фетуса говечета (FBS; Gibco Invitrogen Corporation, NY, U.S.A.), 2mM Л-глутамин (Invitrogen Corporation, NY, U.S.A.), 1% (v/v) мешавине антибиотика и антимицотика (Invitrogen Corporation, NY, U.S.A.), који је у даљем тексту означен као комплетни медијум. У експериментима су коришћене ћелије из 22-25 пасаже.



3.2.

### *Лабораторијске животиње*

*In vivo* експерименти су рађени на мушким јединкама C5BL6 лабораторијских мишева (Jackson Laboratory, Bar Harbor, MA, USA) старости 8-12 недеља и тешине 22-25 грама чуваним у режиму светло-мрак по 12 часова дневно са неограниченим приступом храни и води. Све интервенције на животињама су рађене у дубокој анестезији изазваном кетамин (100mg/kg/i.p.) и ксилазином (10 mg/kg/i.p.). Животиње су еутанизоване ексангвинацијом (трансекција абдоминалне аорте и доње вене каве) у

дубокој анестезији. Овај метод еутаназије је у складу са препорукама панела за еутаназију Америчке ветеринарске асоцијације (Panel of Euthanasia of the American Veterinary Medical association) и препорукама за еутаназију издатих од стране Комитета за коришћење и негу лабораторијских животиња Универзитета у Мичигену (University Committee in Use and Care of Animals, UCUCA).

Ветеринарску негу и надзор је вршио персонал Јединице за негу лабораторијских животиња (Unit for Laboratory Animal Medicine, ULAM) Универзитета у Мичигену по смерницама дефинисаним од стране Америчке асоцијације за лабораторијске животиње (American Association for Laboratory Animal Science, AALAS). Животиње су чуване у условима без патогена специфичних за врсту (Specific Pathogen Free Animals, SPF).

Све процедуре коришћене у *in vivo* експериментима су одобрене од стране Комитета са коришћење и негу лабораторијских животиња Универзитета у Мичигену (University Committee in Use and Care of Animals UCUCA, University of Michigan, USA ) протоколом број PRO00001309.

### 3.3. Експерименталне групе

У студији су формиране 4 експерименталне групе, на следећи начин:

*In vivo*:

1. *Контрола (sham)*- животиње код којих је само урађена инцизија средине врата и након тога зашивене,
2. *Контрола (sham)+Спиро*- животиње са инцизијом врата и третманом спиронолактоном након завршене операције у трајању од 24 часа,
3. *МСАО*- животиње код којих је урађена мождана исхемија 45 минута са реперфузијом од 24 часа,
4. *МСАО+Спиро*- животиње којима је након мождане исхемије од 45 минута дат спиронолактон на почетку реперфузије која је трајала 24 часа.

У свакој групи биће коришћено по 10 животиња. За *in vivo* експерименте третман спиронолактоном се вршио интраперитонеалним давањем у дози од 1mg/kg/дневно на почетку реперфузије.

*In vitro*:

1. *Контрола*- ћелије без икаквог третмана.
2. *Контрола+Спиро*- ћелије третиране спиронолактоном.

3. *I/P*- ћелије изложене исхемији и реперфузији.
4. *I/P*+*Спиро*- ћелије изложене исхемији и реперфузији са третманом спиронолактоном.

Третман спиронолактоном у *in vitro* студији вршио се додавањем медијума са 5 $\mu$ M спиронолактона (Sigma Aldrich) на почетку реперфузије и трајаће до краја реперфузије предвиђене експериментом. У *in vitro* студији биће коришћена по три одвојена сета експеримената.

#### 3.4. Експериментални модели možданог удара

За *in vitro* експерименте као модел možданог удара коришћен је метод кисеонично-глукозне депривације ћелија (OGD) у аноксичној комори (Coy Laboratory) док је за *in vivo* модел изабрана оклузија средње možдане артерије интралуминалним филаментом на С3ВL6 мишевима.

##### 3.4.1. Кисеонично-глукозна депривација

За *in vitro* модел исхемичног možданог удара коришћен је модел кисеонично-глукозне депривације у аноксичној комори (Coy Laboratory, Great Lake MI, U.S.A.). Укратко: ћелије су засађене у посуде за ћелијску културу и одржаване у пуном медијуму до постизања конfluентности у инкубатору на 37 ° C, 10% угљен диоксида и 96% влажношћу. Иницијални број ћелија коришћен у *in vitro* експериментима приликом засађивања био је 2.5 x 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>. Након постигнуте конfluентности ћелије су опране фосфатним пуфером (PBS 1X; Gibco Invitrogen Corporation, NY, U.S.A.) и стављене у медијум без серума (DMEM; Invitrogen; Gibco Invitrogen Corporation, NY, U.S.A.). Пре стављања ћелија, аноксична комора је испуњена мешавином гаса коју су чинили 5%CO<sub>2</sub>, 95%N и 10%H<sub>2</sub> како би се избацио кисеоник. Са идентичном гасном мешавином урађено је и продувавање основног медијума без серума и без глукозе (DMEM No Glucose 1x; Invitrogen; Gibco Invitrogen Corporation, NY, U.S.A.). Ћелијама је замењен медијум у аноксичној комори додавањем основног медијума без серума и глукозе предходно продуваног гасном мешавином. Кисеонично-глукозној депривацији ћелије су биле изложене 5 сати након чега су извађене из аноксичне коморе. Након вађења из аноксичне коморе ћелије су опране фосфатним пуфером и стављене у инкубатор на 37 ° C, при концентрацији CO<sub>2</sub> од 10% (v/v) у основном медијуму који

садржи глукозу 4.5 г/л (DMEM; Invitrogen Corporation, NY, U.S.A.). Реперфузија ћелија у условима нормалне сатурације кисеоником и у медијуму са глукозом трајала је зависно од експеримента 2 и 24 часа. Све ћелије су након истека жељеног времена реперфузијаје обрађене у складу добијања жељеног узорка за даље екперименте.

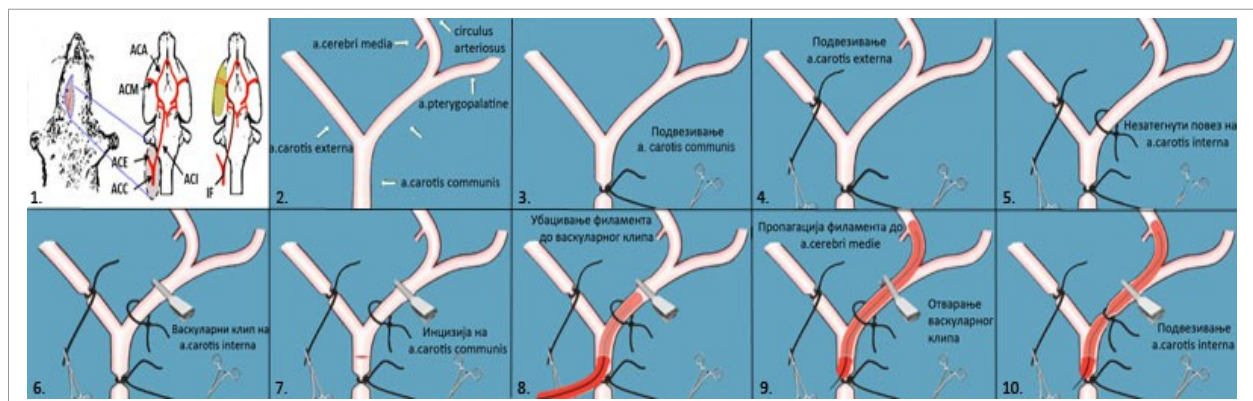
#### 3.4.2. Оклузија средње моздане артерије

Оклузија средње моздане артерије мушким јединкама C5BL6 мишева (Jackson Laboratory, Bar Harbor, MA, USA) рађена је помоћу интралуминалног филамента (Docol Corporation 6021PK5Re) у трајању од 45 минута са реперфузијом од 24 часа по следећем протоколу (Слика 3). У *in vivo* експериментима коришћене су мушке јединке C3BL6 лабораторијских мишева (Jackson Laboratory, Bar Harbor, MA, USA) старости 8-12 недеља и тежине 22-25 грама чуваним у режиму светло-мрак по 12 часова дневно са неограниченим приступом храни и води.

Све интервенције су рађене у дубокој анестезији изазваном кетамином (100mg/kg/i.p.) и ксилазином (10 mg/kg/i.p.). Након анестезирања животиња је постављена на подлогу са грејањем, апарата за одржавање нормалне телесне температуре повезаног са ректалним термометром (Homeothermic Blanket Systems with Flexible Probe; Harvard apparatus, MA, U.S.A.). Урађена је инцизија предњег дела врата и тупа препарација плувачне жлезде. Након препарације плувачне жлезде и уклањања фасција врата лако се примећују споља од једњака (esophagus) и душника (trachea); заједничка каротидна артерија (arteria carotis communis), вагални нерв (nervus vagus), унутрашња каротидна артерија (arteria carotis interna), спољашња каротидна артерија (arteria carotis externa) и каротидно тело (glomus caroticum) (Слика 2. поље 1.). Тупом препарацијом прво су раздвојени вагални нерв од заједничке каротидне артерије а затим препарисана рачва заједничке каротидне артерије. Прво подвезивање урађено је на заједничкој каротидној артерији (arteria carotis communis) што је могуће даље њеној рачви (Слика 2. поље 3.). Након тога је урађено подвезивање спољне каротидне артерије (arteria carotis externa) што је могуће ближе горњој тироидној артерији (arteria tiroidea superior) (Слика 2. поље 4.). Затим је постављен подвез на унутрашњој каротидној артерији на самом њеном почетку одмах након рачве заједничке каротидне артерије, лабаво везан како би се касније осигурала позиција интралуминалног филамента (Слика 2. поље 5.). Следећа је подвезана унутрашња каротидна артерија (arteria carotis interna) што је могуће ближе птеригопалатинеалној артерији (arteria pterigopalatina) (Слика 2. поље 6.). Овим

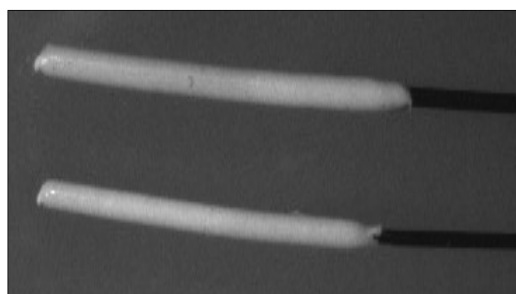


поступком је прекинута циркулација на рачви заједничке каротидне артерије што нам је омогућило обављање даљих хируршких интервенција без крварења. Направљена је инцизија заједничке каротидне артерије близу њеној рачви како би се убацила интралуминална сутура (Doccol Corporation 6021PK5Re) (Слика 2. поље 7.). На месту ицизије заједничке каротидне артерије убачена је интралуминална сутура, која је угурана кроз унутрашњу каротидну артерију до подвеза који је направљен на унутрашњој каротидној артерији (Слика 2. поље 8.).



Слика 2. Шематски приказ мишјег модела исхемичног možданог удара интралуминалном оклузијом средње možдане артерије.

Након чега се лагано затегне лабаво везана сутура на унутрашњој каротидној артерији како би се спречило ретроградно крварење након одвезивања подвеза направљеног ближе птеригопалатинеалној артерији на унутрашњој каротидној артерији. Након одвезивања подвеза на унутрашњој каротидној артерији направљеног ближе птеригопалатинеалној артерији наставља се са убацивањем интралуминалног филамента у дужини од 8 mm од рачве заједничке каротидне артерије односно док се не осети благи отпор при инсертовању филамента (Слика 2. поље 9.). Код овог корака



најважније је избећи убацивање интралуминалног филамента у птеригопалатинеалну артерију. У случају да филament уђе у птеригопалатинеалну артерију немогуће је достићи дужину угураног филамента од 8 mm мерено од рачве заједничке

каротидне артерије. Након убацивања интралуминалног филамента 8 mm од рачве заједничке каротидне артерије односно након благог отпора даљем угуравању

филамента притегне се лабаво везана лигатура на унутрашњој каротидној артерији како би се осигурао положај филамента (Слика 2. поље 9.). Животињи се даје 500  $\mu$ l физиолошког раствора како би се надокнадила течност изгубљена у току хируршке интервенције. За време од 45 минута исхемије животиња је остављена на подлогу са грејањем, апарата за одржавање нормалне температуре повезаног са ректалним термометром на коме се радила целокупна хируршка интервенција. Након истека 45 минута исхемије предвиђене експериментом одвеже се лигатура унутрашње каротидне артерије, извуче филament и поново притегне лигатура на унутрашњој каротидној артерији како би се спречило крварење. Животињи се опет да 500  $\mu$ l физиолошког раствора и остави на подлогу са грејањем, апарата за одржавање нормалне телесне температуре повезаног са ректалним термометром. Након буђења из анестезије животиње се пребацују у кавез са неограниченим приступом храни и води следећих 24 часа што представља време реперфузије предвиђено експериментом.

### 3.5. Детекција информационих рибонуклеинских киселина (иРНК)

Након култивације bEnd.3 ћелија у посуду за културу пречника 60 mm (Colstar; Corning Incorporated, NY, U.S.A.) и постигнуте конfluентности (укупно  $2.5 \times 10^6$  ћелија) ћелије су изложене исхемији у аноксичној комори и реперфузији од 24 часа са или без третмана спиронолактоном по већ описаном моделу након чега је изолована укупна количина рибонуклеинске киселине (иРНК) коришћењем методе помоћу Тризола. Вршена је детекција иРНК за следеће цитокине: TNF- $\alpha$ , RANTES, IL6, MCP-1, IL1- $\beta$ , CXCL5, iNOS, eNOS и као интерна контрола GAPDH. Укратко: најпре су ћелије опране хладним фосфатним пуфером (PBS 1X; Gibco Invitrogen Corporation, NY, U.S.A.) након чега су лизирани директним додавањем 1 ml Тризол реагенса (Invitrogen Corporation, NY, U.S.A.) и огуљене пластичном гребалим. Садржај је пребачен у пластичну епендорфицу од 1.5 ml и неколико пута провучен кроз иглу димензија 25Г како би се лизат боље хомогенизовао. Узорци су инкубирани на собној температури (15 до 30 °C) 5 минута како би се добила комплетна дисоцијација нуклеопротеинских комплекса. Након инкубације приступило се сепарисању фаза узорака додавањем 0.2 ml хлороформа, енергичним мућкањем садржаја 15 секунди и инкубирањем на собној температури 2-3 минута. По завршетку инкубације узорци су центрифугирани у предходно подешеној микроцентрифуги на 4 ° C на 12000 x g 15 минута.

Центрифугирањем се садржај сепарише на три фазе: доња црвена фаза (фенол-хлороформ фаза), бела интерфаза и горња безбојна течна фаза у којој се налазе рибонуклеинске киселине. У издвојену течну фазу је потом додато 0.5 ml изопропил алкохола како би се преципитирала издвојена количина рибонуклеинске киселине. Након додавања изопропанола и инкубације од 10 минута на собној температури, приступило се центрифугирању садржаја на 12000 x g у микроцентрифуги подешеној на 4 ° C 10 минута. Центрифугирањем се добио видљив пелет исталожених рибонуклеинских киселина који је затим опран са 1 ml 75% етил-алкохола. Након испирања, издвојена укупна РНК је растворена у 20 µl ТЕ пуфера (10 mM TRIS-HCl, 1mM EDTA, pH 7.4). По растварању укупне РНК, одређивана је најпре њена чистоћа мерењем апсорбанце узорка на 260 и 280 nm таласне дужине UV спектрофотометром ( Pharmacia LKB Ultrospec III; Pharmacia, NY,U.S.A.) и израчунавање чистоће из односа  $A_{260}/A_{280}$ , а затим је одређивана концентрација укупне РНК у 2 µl узорка разблаженог до 100 µl ТЕ пуфером израчунавањем из формуле:

Укупна РНК ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) =  $A_{260}$  (апсорбанца узорка на 260nm) x 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  x дилуциони фактор (100/2)

Пошто је израчуната концентрација укупне РНК у узорку, приступило се најпре њеном превођењу у комплементарне дезоксирибонуклеинске киселине (кДНК), процесом означеним као реверзна транскрипција (РТ), а затим извођењу ланчане реакције полимеразом (PCR), помоћу комерцијално набављених китова за ензимско превођење РНК у кДНК молекуле (SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase; Invitrogen Corporation, NY, U.S.A) као и даље умножавање жељених кДНК молекула помоћу специфичних прајмера. Прајмери коришћени за умножавање иРНК за RANTES су предњи CTGGGATGAAGATCTCTGCAG задњи CTAGCTCATCTCCAAATAGTTG, за IL6 предњи GTTCTCTGGGAAATCGTGGGA задњи GGA AATTGGGGTAGGAAGGA, за TNF- $\alpha$  предњи GGCCTTCCTACCTTCAGACC задњи AGCAAAAGA GGAGGCAACA, за MCP-1 предњи AGCACCAGCCAACTCCCCTG задњи AGAAGTGCTTGAGGTGGTTGT, за IL-1 $\beta$  предњи CAGGCAGGCAGTATCACTCA задњи AGG CCACAGGTATTCTGTCTG, за CXCL5 предњи CTCAGTCATAGCCGCAACCGAG задњи CGCTTCTTTCCAA TGCGAGTGC, за iNOS предњи AGCATCACCCCTGTGTTCCACC задњи TGGGACA GTCTCCATTCCCA, за eNOS предњи CTGCTGCCCGAGATATCTTC задњи CTGGTACTGCAGTCCCTCCT и

за GAPDH предњи GTCATTGACAGCAATGCCAG задњи  
GTGTTCCSTACCCCAATGTG.

Реверзна транскрипција (РТ) метода укратко, направљена је мешавина укупне РНК (количина укупне РНК је износила 2 µg), 1 µl раствора oligo (dT)<sub>12-18</sub> (500 µg/ml Invitrogen Corporation, NY, U.S.A) и 1µl раствора 2'-деоксинуклеотид 5'-трифосфата (dNTP, Invitrogen Corporation, NY, U.S.A), која је потом допуњена до 12 µl дестилованом водом и загревана 5 минута на 65 °C у PCR машини (PTC-200 Paltier Thermal Cycler; MJ Research, U.S.A.) По завршетку загревања садржај је стављен на лед пар минута након чега је додато 4µl 5X пуфера за синтезу једноланчаних кДНК молекула (5X First-Strand Buffer Invitrogen Corporation, NY, U.S.A), 1 µl рекомбинантног инхибитора рибонуклеаза (40 јединица/µl; RNaseOUT; Invitrogen Corporation, NY, U.S.A) и 2 µl 0.1M дитиотреитола (DTT; Invitrogen Corporation, NY, U.S.A), а након 2 минута инкубације мешавине на 42 °C у PCR машини, 1 µl ензима реверзне транскриптазе (200 units SuperScript™ II Reverse Transcriptase; Invitrogen Corporation, NY, U.S.A). Мешавина је затим инкубирана 50 минута на 42 °C у PCR машини. После завршене инкубације, да би се извршила инактивација додатих ензима, мешавина је загревана 15 минута на 70 °C у PCR машини. По настанку кДНК молекула, уклањање РНК је извршено додавањем 1 µl (2 јединице) рибонуклеазе X (RNase H; Invitrogen Corporation, NY, U.S.A), ендонуклеазе која специфично деградира РНК ланац. Одређени кДНК молекули су затим подвргнути амплификацији помоћу PCR.

Укратко: направљена је мешавина 5 µl синтетисаних кДНК молекула, 0.5 µl ензима полимеразе (Platinum Taq DNA Polimerase 5 units/µl; Invitrogen Corporation, NY, U.S.A), 1 µl раствора 2'-деоксинуклеотид 5'-трифосфата (10mM dNTP, Invitrogen Corporation, NY, U.S.A), 2 µl мешавине предњег и задњег прајмера (10µM сваки прајмер) и 1.5 µl 50mM MgCl<sub>2</sub> која је допуњена до 50 µl водом без рибонуклеаза и дезоксирибонуклеаза (Distilled Water DNase, RNase Free; Invitrogen Corporation, NY, U.S.A.). Затим је извршена PCR амплификација жељених кДНК молекула у PCR машини програмираној тако да је почетна денатурација кДНК молекула (2 минута на 94 °C) била праћена серијом од 28 узастопних циклуса од којих се сваки састојао од денатурације кДНК (1 минут на 94 °C), везивања прајмера (4 минута на 55 °C) и издуживања везаних прајмера (3 минута на 72 °C), након чега је уследило додатно издуживање прајмера (10 минута на 72 °C).

Раздвајање синтетисаних PCR продуката постигнуто је применом електрофорезе у 2% агароза гелу направљеном у 1X Трис-борат-ЕДТА пуферу (ТВЕ; 0.089M Трис-база,

0.002M ЕДТА, 0.089M борна киселина, рН 8) у који је по растварању агарозе додат 1  $\mu$ l флуоресцентног етидијум бромида (0.5  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.). Анализирано је по 10  $\mu$ l узорка и позитивне контроле. Наношењу мешавине узорака и позитивне контроле на гел предходило је њихово мешање са 2  $\mu$ l 6X обојеног пуфера за пуњење гела (Gel loading buffer; Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.). У циљу идентификације умножених фрагмената на основу броја базних парова, на гел је нанет и ДНК маркер (1kb+ DNA marker; Invitrogen Corporation, NY, U.S.A.). По завршеној електрофорези, гел је осветљен ултравиолет светлом и фотографисан. Добијени резултати су даље обрађени у компјутерском програму Image J ( Image J,NIH).

### 3.6. Имуноблотинг протеина (Western blot)

Експресија протеина iNOS, I $\kappa$ B- $\alpha$ , фосфорилисаног I $\kappa$ B- $\alpha$  (p- I $\kappa$ B- $\alpha$ ), ICAM-1 и  $\beta$ -актин у мишијим ендотелним ћелијама мозга (bEnd.3 ћелије) испитивана је методом имуноблотинга протеина познатом под називом Western blot. Из лизата целог ткива након *in vivo* експеримента урађен је имуноблотинг за детекцију експресије eNOS, iNOS, ICAM и  $\beta$ -актин протеина.

Укратко: мишије ендотелне ћелије су засађене у посуду за ћелијску културу пречника 60mm, у комплетном медијуму. Након постигнуте конfluентности ћелије су изложене исхемији у аноксичној комори по већ описаном моделу кисеонично-глукозне депривације са реперфузијом од 2 сата за испитивање експресије I $\kappa$ B- $\alpha$  и фосфорилисаног I $\kappa$ B- $\alpha$  и са реперфузијом од 24 сата за испитивање експресије iNOS и ICAM-а. Након завршетка реперфузије ћелије су опране фосфатним пуфером (PBS 1X; Gibco Invitrogen Corporation, NY, U.S.A.) и затим извршена екстракција протеина хомогенизацијом ћелија у RIPA пуферу (pH 7.6) и центрифугирањем хомогената 5 минута на 4°C при 14000 g. Течна фаза је након тога пребачена у чисту епендорфицу и даље коришћена за одређивање протеина и имуноблотинг.

За *in vivo* експеримент, након оклузије средње мождане артерије помоћу интралуминалне сутуре од 45 минута и реперфузијом од 24 часа по описаном моделу животиње су еутанизоване и декапитацијом узето ткиво мозга за хомогенизацију у RIPA пуферу. Након хомогенизације помоћу механичког хомогенизатора (Polytron® PT-MR 3100, Kinematica AG, Swizerland.) узорак је исцентрифугиран на 10000g 5 minuta у пре тога подешеној центрифуги на 4°C. Након центрифугирања течна фаза је

пребачена у чисту епендорфицу и даље коришћена за одређивање протеина и имуноблотинг.

У састав RIPA пуфера, направљеног у дестилованој води улазили су: Трис-НСl (50mM; Bio-rad, CA, U.S.A), NaCl (150mM; Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.) 0.5% натријум-деоксихолат (Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.), 1% Тритон X-100; Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.), 0.1% натријум-додецил сулфат (SDS; Bio-rad, CA, U.S.A), натријум ортованадат (2mM; Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.) и инхибитори протеиназа, ЕДТА (1mM; Mallinckrodt Speciaty Chemicals Co, U.S.A), аprotинин (10 µg /ml; Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.), леупептин (10 µg /ml; Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.), фенилметилсулфонил флуорид (1mM Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.). Одређивање протеина по завршеном центрифугирању у издвојеној течној фази узорака рађена је помоћу комерцијално набављеног кита за колориметријску детекцију и квантификацију укупних протеина (BCA Protein Assay Reagent Kit; Pierce, U.S.A), а према упутству приложеном уз кит. Укратко: најпре су направљени раствори албумина из серума говечета (BSA; достављени у киту) у RIPA пуферу. Концентрација албумина у растворима је износила 2000 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 5 µg/ml. Потом је по 100 µl ових раствора и издвојених течних фаза испитиваних узорака пренето у епрувете величине 10x75 mm (Disposable Culture Tubes Barosilicate Glass; Fisher Scientific, U.S.A). У епрувете је затим додато по 2 ml тзв. радног раствора. Радни раствор се састојао од педесет делова реагенса А (достављен у киту) и једног дела реагенса Б (достављен у киту). По додавању радног раствора, епрувете су инкубиране 30 минута на 37°C у сувом купатилу (Dry Bath Incubator; Fisher Scientific, U.S.A) након чега је уследило мерење апсорбанце испитиваних узорака и раствора серума помоћу ултравиолет спектрофотометра на 562 nm таласне дужине и одређивање концентрације укупних протеина из стандардне криве раствора серума. Испитивани узорци и раствори серума тестирани су у дубликату. Као бланк контрола послужиле су епрувете у којима се налазио само RIPA пуфер у количини од 100 µl. Једнаке количине протеина узорака (20 µg-40 µg) су након мешања са Леамли пуфером узорка (Sample Buffer, Leammli; Sigma-Aldrich, MO, U.S.A) и загревањем од 5 минута на 100°C, подвргнуте СДС-полиакриламид гел електрофорези (SDS-PAGE) у апарату за електрофорезу (Mini Trans Blot, BioRad, CA, U.S.A), при константном напону струје од 100V на собној температури. Као гелови су, у зависности од молекулске тежине испитиваног протеина, коришћени 7.5 % Трис-НСl гел (BioRad, CA, U.S.A) за eNOS, iNOS и ICAM док је за IκB-α и p-IκB-α коришћен 10% Трис-НСl гел (BioRad, CA,

U.S.A).  $\beta$ -актин је коришћен као интерна контрола код одређивања експресије сваког од наведених протеина. Заједно са узорцима електрофорези је подвргнута и мешавина седам различито обојених протеина молекулске тежине од 200000-6500 далтона (Koleidoscope Prestained Standards; BioRad CA, U.S.A) која је послужила за идентификацију испитиваног протеина на основу његове молекулске тежине. По раздвајању протеина електрофорезом, извршен је њихов пренос на нитроцелулозну мембрану (Trans-Blot; BioRad, CA, U.S.A) у електричном пољу, у апарату за електроблотинг (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transver Cell; BioRad, CA, U.S.A). Пренос протеина је трајао 2 сата, при константном напону од 50V на температури од 4° C. Нитроцелулозна мембрана са пренесеним протеинима тј. блот је потом испрана у сланом Трис пуферу који је садржао детерђент (Tris buffer saline, Tween-20: TBS) pH 7.5. У саставу овог пуфера направљеног у дестилованој води, улазили су 0.9% NaCl, 10mM Tris и 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich, MO, U.S.A). По испирању блота приступило се имунохемијској детекцији испитиваних протеина пренесених на мембрану. У циљу блокирања неспецифичног везивања антитела на нитроцелулозној мембрани, блот је најпре инкубиран 1 сат на собној температури у блокирајућем пуферу. Блокирајући пуфер је направљен тако што је у TBS пуфер додато млеко у праху без масти. Концентрација млека у пуферу је износила 5% (w/v). Након извршене блокаде, уследило је поновно испирање блота у TBS пуферу, а потом његова инкубација преко ноћи на 4° C у блокирајућем пуферу заједно са примарним антителом усмереним против испитиваног протеина. Као примарна антитела коришћена су: мишје анти-eNOS/NOS2 антитело (BD Bioscience; NJ, U.S.A) у разблажењу 1:5000, мишје анти-iNOS/NOS2 (BD Bioscience; NJ, U.S.A) антитело у разблажењу 1:2000, зечије анти-I $\kappa$ B- $\alpha$  антитело (Cell Signaling Technology; MA, U.S.A) у разблажењу 1:1000, зечије анти p-I $\kappa$ B- $\alpha$  (Cell Signaling Technology; MA, U.S.A) у разблажењу 1:1000 и козије анти-ICAM антитело (R&D Systems; MN, U.S.A) у концентрацији од 0.1  $\mu$ g/ml. По завршеној инкубацији блота са примарним антителом, блот је испран више пута а затим инкубиран 1 сат на собној температури у блокирајућем пуферу заједно са секундарним антителом коњугованим пероксидазом рена (HRP). Као секундарна антитела коришћена су: козије анти-мишје IgG антитело коњуговано пероксидазом рена (BioRad, CA, U.S.A) у разблажењу 1:2000, козије анти-зечије IgG антитело коњуговано пероксидазом рена (BioRad, CA, U.S.A) у разблажењу 1:2000 и коњским анти-козијим IgG антитело коњуговано пероксидазом рена (BioRad, CA, U.S.A) у разблажењу 1:2000. Након завршене инкубације са одговарајућим секундарним

антителом уследило је испирање блота у пуферу. Визуализација имунореактивних трака на блоту рађена је инкубацијом блота у мешавини еквивалентних количина раствора појачивача хемилуминисценце и стабилног раствора пероксида. Оба раствора су набављена као део комерцијалног кита (Super Signal® West Femto; Thermo Scientific, U.S.A) и излагањем блота рендген филму (x-OMAT AR Film; Kodak, U.S.A.). Као интерна контрола блота након визуализације излагањем рендген филму, сваки блот је рестауриран коришћењем комерцијално набављеног кита за рестаурацију блота (Restore™ Western Blot Stripping Buffer; Pierce, NJ, U.S.A.) инкубацијом блота у овом пуферу 10 минута и потом цео поступак понављан коришћењем зечијег анти- $\beta$ -актин примарног антитела (Cell Signaling Technology; MA, U.S.A) у разблажењу 1:1000 и секундарног антитела козије анти-зечије IgG коњугованог пероксидазом рена (BioRad, CA, U.S.A) у разблажењу 1:2000. Дензитометријска анализа рендген филма урађена је помоћу Image J компјутерског програма (NIH).

### *3.7. Имунофлуоресцентно бојење и конфокална микроскопија*

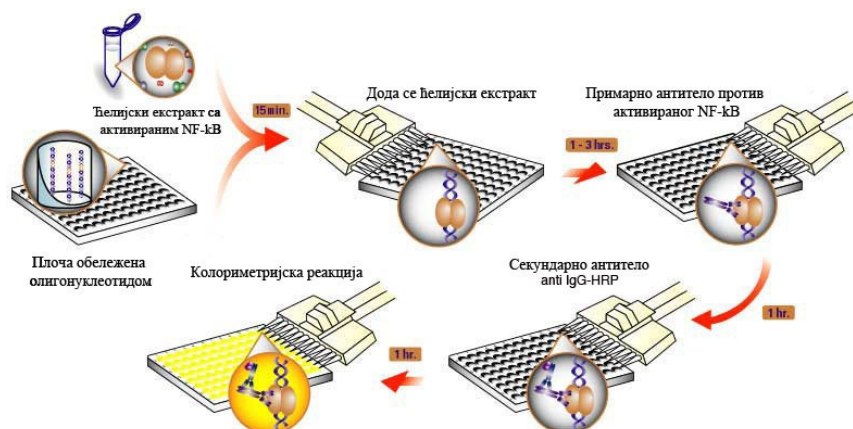
Имунофлуоресцентно бојење NF $\kappa$ B транскрипционог фактора у bEnd.3 ћелијама вршено је према следећем протоколу: bEnd.3 ћелије предходно засађене у коморице за ћелијску културу (Lab-Tek Chamber Slide System Fisher Scientific, U.S.A) изложене су кисеонично-глукозној депривацији по описаном протоколу са реперфузијом од 2 сата. Након завршетка реперфузије све експерименталне групе ћелија су фиксирани помоћу 3.7% раствора формалдехида у фосфатном пуферу 20 минута на собној температури, а затим пермеабелизоване помоћу 0.1% Tritona X-100 (Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.) раствореног у фосфатном пуферу. По завршеној пермеабелизацији ћелија, приступило се блокади неспецифичног антиген везивања инкубацијом ћелија у фосфатном пуферу који је садржао албумин из телећег серума у концентрацији од 2% (блокирајући раствор) 1 сат на собној температури. Након завршене блокаде неспецифичног антиген везивања, ћелије су инкубирани преко ноћи на 4 °C са примарним антителом против NF $\kappa$ B p65 (Santa Cruz Biotechnology Inc, U.S.A.) направљеним у зецу. Примарно антитело је растворено у блокирајућем раствору у односу 1:200. У циљу визуализације примарног антитела ћелије су инкубирани у секундарном анти-зечијем антителу коњугованим флуоресцеином у разблажењу 1:200. Секундарно антитело је такође растворено у блокирајућем раствору. Након завршеног имунофлуоресцентног бојења ћелије су посматране под микроскопом (confocal laser scanning microscope LSM 510



Zeiss, objectiv 40x1.3, Germany). У току микроскопирања направљене су слике у насумично изабраних видних поља које су затим обрађиване у компјутерском програму Adobe Photoshop.

### 3.8. Одређивање активираниог NFκB P65 комплекса

Одређивање активираниог NFκB рађено је коришћењем комерцијалног кита (TransAM® NFκB P65 Kit, Active Motif, USA). Овај кит је базиран на ензимско везаном имуноабсорбцијском тесту (ELISA) како би се детектовала и квантификовала количина активираниог NFκB. Овај кит се састоји од плоче са 96 поља које су обложене олигонуклеотидном секвенцом (5'-GGGACTTCC-3') заједничком за све NFκB молекуле. Принцип саме методе се заснива на имобилизацији активираниог NFκB из ћелијског лизата олигонуклеотидом обложеном плочом. Након везивања активираниог NFκB за олигонуклеотид на плочи додаје се примарно антитело које се специфично везује за епитоп на p65 који је доступан само кад је NFκB активан и везан за ДНК. За детекцију примарног антитела додаје се секундарно антитело коњуговано пероксидазом рена (anti IgG-HRP). Активација секундарног антитела коњугованог пероксидазом рена омогућује сензитивно колориметријско мерење помоћу спектрофотометра (Слика 4). Упоредо се прави стандардна крива серијске дилуције рекомбинантног NFκB познате концентрације достављеног у киту како би се вршила квантификација активираниог NFκB из узорака.



Слика 3. Шематски приказ одређивања активираниог NFκB рађено је коришћењем комерцијалног кита (TransAM® NFκB P65 Kit, Active Motif, USA).

Укратко: мишије ендотелне ћелије су засађене у посуду за ћелијску културу пречника

60mm, у комплетном медијуму. По постигнутој конфлуентности ћелије су изложене исхемији у аноксичној комори по већ описаном моделу кисеонично-глюкозне депривације са реперфузијом од 2 сата. Након реперфузије приступило се припреми узорака целог ћелијског лизата. Посуде за ћелијску културу су стављене на лед и додат је пуфер за лизирање достављен у киту коме је додат 1М ДТТ и коктел инхибитора протеаза такође достављени у киту. Након хомогенизације приступило се центрифугирању хомогената 5 минута на 4 °С при 14000 g. Течна фаза је пребачена у чисту епендорфицу и даље коришћена за одређивање протеина. Одређивање протеина по завршеном центрифугирању у издвојеној течној фази узорака рађена је помоћу комерцијално набављеног кита за колориметријску детекцију и квантификацију укупних протеина (BCA Protein Assay Reagent Kit; Pierce, U.S.A), а према упутству приложеном уз кит. Укратко: најпре су направљени раствори албумина из серума говечета (BSA; достављени у киту) у пуферу за лизирање у коме су и узорци припремани. Концентрација серума у растворима је износила 2000 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 5 µg/ml. Потом је по 100 µl ових раствора и издвојених течних фаза испитиваних узорака пренето у епрувете величине 10x75 mm (Disposable Culture Tubes Barosilicate Glass; Fisher Scientific, U.S.A). У епрувете је затим додато по 2 ml тзв. радног раствора. Радни раствор се састојао од педесет делова реагенса А (достављен у киту) и једног дела реагенса Б (достављен у киту). По додавању радног раствора, епрувете су инкубиране 30 минута на 37 °С у сувом купатилу (Dry Bath Incubator; Fisher Scientific, U.S.A) након чега је уследило мерење апсорбанце испитиваних узорака и раствора серума помоћу спектрофотометра на 562 nm таласне дужине и одређивање концентрације укупних протеина из стандардне криве раствора серума. Испитивани узорци и раствори серума тестирани су у дупликату. Као бланк контрола послужиле су епрувете у којима се налазио само пуфер за лизирање у количини од 100 µl. Након одређивања количине протеина приступило се извођењу есеја. Целокупна процедура је извођена у дупликату у три независне серије експеримената. На самом почетку есеја у свако поље додато је по 30 µl комплетног везујућег пуфера који се састојао од везујућег пуфера достављеног у киту, коме је накнадно додато 1М ДТТ и ДНК из сперме харинге по упутству за припрему пуфера како би се блокирало неспецифично везивање. Затим је у свако поље плоче додато по 20 µl узорка раствореног у комплетном пуферу за лизирање са укупном концентрацијом протеина од 40µg. Као позитивна контрола додато је 20 µl Jurkat нуклеарног екстракта разблаженог 1:20 по упутству произвођача. За негативну

контролу додато је 20  $\mu$ l пуфера за лизирањен ћелија. Инкубација је трајала 1 сат на собној температури при агитацији од 100 rpm на ротирајућој платформи. По завршетку инкубације сва поља су опрана три пута са по 200  $\mu$ l пуфера за прање достављеног у киту. Након прања у свако поље је додато 100  $\mu$ l примарног антитела раствореног 1:1000 по препоруци произвођача у везујућем пуферу. Инкубација примарног антитела трајала је 1 сат на собној температури без агитације. По завршетку инкубације поља на плочи су опрана три пута са по 200  $\mu$ l пуфера за прање, након чега је додато 100  $\mu$ l секундарног антитела коњуговано пероксидазом рена разблаженог 1:1000 у везивајућем пуферу по препоруци произвођача. Инкубација секундарног антитела је трајала 1 сат на собној температури без агитације. Након везивања секундарног антитела за примарно антитело сав вишак невезаног секундарног антитела је опран серијом од три прања са по 200  $\mu$ l пуфера за прање достављеног у киту. Након везивања и стварања комплекса примарног и секундарног антитела коњугованог пероксидазом рена приступило се колориметријској реакцији додавањем 100  $\mu$ l мешавине еквивалентних количина раствора појачивача хемилуминисценце и стабилног раствора пероксида достављених у киту и инкубације од 30 секунди у мраку. Након 30 секунди је додато 100  $\mu$ l раствора за стопирање реакције и читана абсорбанца на спектрофотометру на таласној дужини од 450 nm са референтном таласном дужином од 655 nm. Како би се квантификовала вредност активираниог NF $\kappa$ B користила се абсорбанца добијена из стандардне криве серијских дилуција познате концентрације. За израду стандардне криве спроведен је цео поступак есеја само што је уместо узорака додавана серијска дилуција рекомбинантног NF $\kappa$ B, добијеног у киту, тако да се као финална концентрација добила 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156 и 0.0 ng/пољу плоче. Вредноста абсорбанце узорака на у осе је продужена хоризонтално до стандардне криве а затим од њиховог пресека вертикално до x осе где се читава количина активираниог NF $\kappa$ B у ng/пољу плоче.

### 3.9. Одређивање експресије инфламаторних цитокина

За мерење експресија цитокина из лизата ткива мозга након *in vivo* експеримената као и из медијума колектованог након *in vitro* експеримената корисно се комерцијални кит (RayBio Mouse Cytokine Antibody Array 3) којим се одређивала експресија 62 различита цитокина, адхезионих молекула и хемокина. Овом методом смо анализирали секретоване цитокине из медијума након *in vitro* и из ткива након *in vivo*

експериментата. Метода се базира на микроереј чип техници у комбинацији са колориметријском детекцијом.

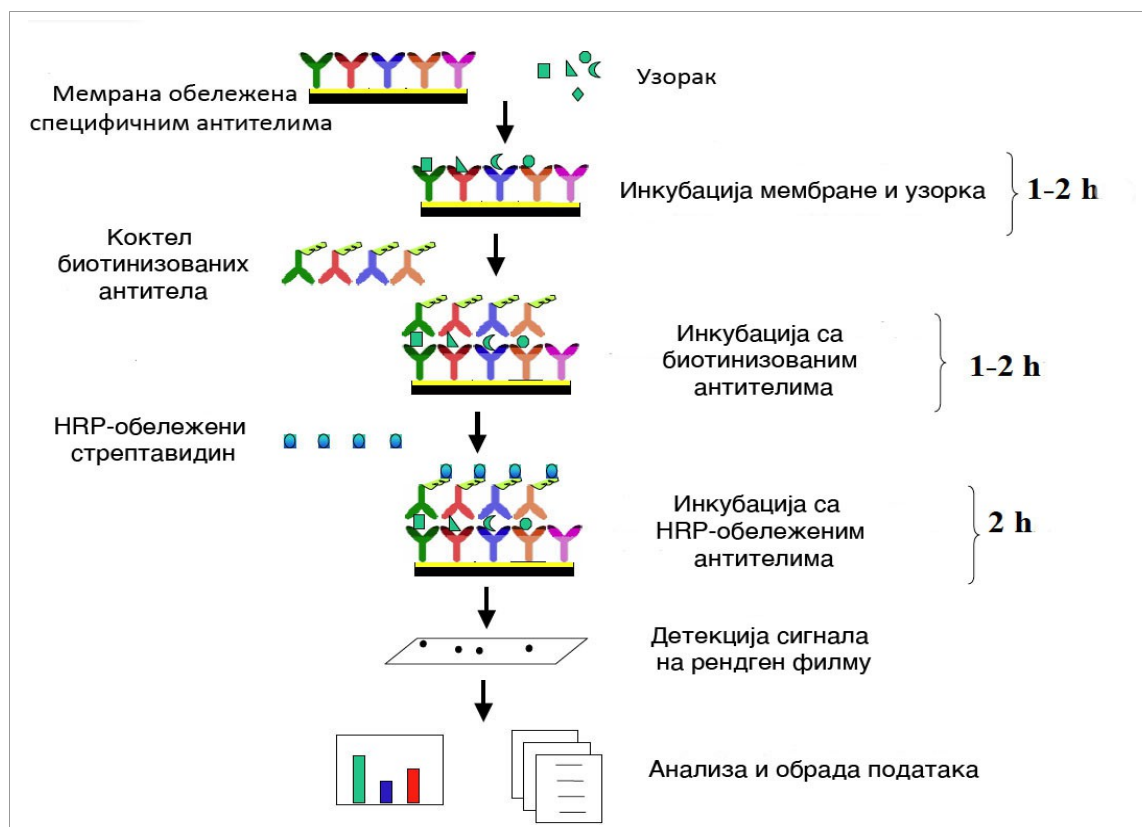
Укратко: мишије ендотелне ћелије су засађене у посуду за ћелијску културу пречника 60mm, у комплетном медијуму. Након постигнуте конфлуентности ћелије су изложене исхемији у аноксичној комори по већ описаном моделу кисеонично-глукозне депривације са реперфузијом од 24 сата у 3ml основног медијуму који садржи глукозу 4.5 г/л (DMEM; Invitrogen Corporation, NY, U.S.A.) По завршетку реперфузије колектован је медијум из посуда и даље коришћен за анализу. За *in vivo* експеримент, након оклузије средње мождане артерије помоћу интралуминалне сутуре од 45 минута и реперфузије од 24 часа по описаном моделу животиње су еутанизоване и декапитацијом узето ткиво мозга за хомогенизацију у RIPA пуферу. Након хомогенизације помоћу механичког хомогенизатора (Polytron® PT-MR 3100, Kinematica AG, Swizerland.) узорак је исцентрифугиран на 10000g 5 minuta у пре тога подешеној центрифуги на 4°C. Након центрифугирања течна фаза је пребачена у чисту епендорфицу и даље коришћена за одређивање протеина и микроереј анализу.

RayBio® Mouse Cytokine Antibody Array III														
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	POS	POS	POS	POS	Blank	Axl	BLC	CD30 L	CD30 T	CD40	CRG-2	CTACK	CXCL16	Eotaxin
2	NEG	NEG	NEG	NEG	Blank	Axl	BLC	CD30 L	CD30 T	CD40	CRG-2	CTACK	CXCL16	Eotaxin
3	Eotaxin-2	Fas Ligand	Fractalkine	GCSF	GM-CFS	IFN $\gamma$	IGFBP-3	IGFBP-5	IGFBP-6	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-3	IL-3 Rb
4	Eotaxin-2	Fas Ligand	Fractalkine	GCSF	GM-CFS	IFN $\gamma$	IGFBP-3	IGFBP-5	IGFBP-6	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-3	IL-3 Rb
5	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-12 p70	IL-13	IL-17	KC	Leptin R	LEPTIN(OB)	LIX	L-Selectin
6	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-12 p70	IL-13	IL-17	KC	Leptin R	LEPTIN(OB)	LIX	L-Selectin
7	Lymphotactin	MCP1	MCP-5	M-CSF	MIG	MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\gamma$	MIP-2	MIP-3 $\beta$	MIP-3 $\alpha$	PF-4	P-Selectin	RANTES	SCF
8	Lymphotactin	MCP1	MCP-5	M-CSF	MIG	MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\gamma$	MIP-2	MIP-3 $\beta$	MIP-3 $\alpha$	PF-4	P-Selectin	RANTES	SCF
9	SDF-1 $\alpha$	TARC	TCA-3	TECK	TIMP-1	TNF $\alpha$	TNF RI	TNF RII	TPO	VCAM-1	VEGF	Blank	Blank	Blank
10	SDF-1 $\alpha$	TARC	TCA-3	TECK	TIMP-1	TNF $\alpha$	TNF RI	TNF RII	TPO	VCAM-1	VEGF	Blank	POS	POS

Табела 1. Приказ 62 различита цитокина одређивана помоћу комерцијалног кита RayBio Mouse Cytokine Antibody Array 3

У састав RIPA пуфера, направљеног у дестилованој води улазили су: Трис-НСl (50mM; Bio-rad, CA, U.S.A), NaCl (150mM; Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.) 0.5% натријум-деоксихолат (Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.), 1% Тритон X-100; Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.), 0.1% натријум-додецил сулфат (SDS; Bio-rad, CA, U.S.A), натријум ортованадат (2mM; Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.) и инхибитори протеиназа, ЕДТА (1mM; Mallinckrodt Speciaty Chemicals Co, U.S.A), аprotинин (10  $\mu$ g /ml; Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.), леупептин (10  $\mu$ g /ml; Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.), фенилметилсулфонил флуорид (1mM Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.). Одређивање протеина по завршеном центрифугирању у издвојеној течној фази узорака рађена је помоћу комерцијално

набављеног кита за колориметријску детекцију и квантификацију укупних протеина (BCA Protein Assay Reagent Kit; Pierce, U.S.A), а према упутству приложеном уз кит. Укратко: најпре су направљени раствори албумина из серума говечета (BSA; достављени у киту) у RIPA пуферу. Концентрација серума у растворима је износила 2000  $\mu\text{g/ml}$ , 1500  $\mu\text{g/ml}$ , 1000  $\mu\text{g/ml}$ , 750  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$ , 125  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ . Потом је по 100  $\mu\text{l}$  ових раствора и издвојених течних фаза испитиваних узорака пренето у епрувете величине 10x75 mm (Disposable Culture Tubes Barosilicate Glass; Fisher Scientific, U.S.A). У епрувете је затим додато по 2 ml тзв. радног раствора. Радни раствор се састојао од педесет делова реагенса А (достављен у киту) и једног дела реагенса Б (достављен у киту). По додавању радног раствора, епрувете су инкубиране 30 минута на 37°C у сувом купатилу (Dry Bath Incubator; Fisher Scientific, U.S.A) након чега је уследило мерење апсорбанце испитиваних узорака и раствора серума помоћу ултравиолет спектрофотометра на 562 nm таласне дужине и одређивање концентрације укупних протеина из стандардне криве раствора серума. Испитивани узорци и раствори серума тестирани су у дупликату. Као бланк контрола послужиле су епрувете у којима се налазио само RIPA пуфер у количини од 100  $\mu\text{l}$ . Сви узорци добијени након *in vivo* експеримента су пре наношења на мембрану подешени на 500  $\mu\text{g/ml}$  док је за анализу након *in vitro* експеримената коришћено по 1 ml колектованог медијума из сваке групе. Након завршетка припреме узорака на микроереј мембране је додато по 2ml блокирајућег пуфера, добијеног у киту, да се инкубирају преко ноћи на 4°C. Наредног дана је одливен блокирајући пуфер и додато по 1 ml узорка. Инкубација мембрана са додатим узорком је такође трајала преко ноћи на 4°C. са завршетком инкубације мембране су опране три пута са по 2 ml пуфером за прање 1 достављеног у киту и два пута пуфером за прање 2 такође достављеног у киту. Након прања приступило се инкубацији мембрана са по 1 ml раствореног антитела коњугованог биотином у трајању од 2 сата на собној температури.



Слика 5. Шематски приказ одређивања експресије инфламаторних цитокина комерцијалним китом RayBio Mouse Cytokine Antibody Array 3

Након завршетка инкубације мембране и формирања тзв. сендвич комплекса између антитела на мембрани са једне стране, узорка и антитела кођугованог биотином са друге стране приступило се њиховом детектовању на рентген филму. Мембране су најпре опране пуфером за прање 1 и 2 као у прошлом кораку и затим инкубиране са стрептавидином кођугованим пероксидазом рена (HRP). За активацију HRP свакој мембрани је додата мешавина 250 ml реагенса Ц и 250 ml реагенса Д достављених од стране произвођача кита. Након одливања вишка мешавине реагенса Ц и Д мембране су изложене рентген филму у мрачној соби у трајању од 20 секунди. Добијени блот је даље дензитометријски анализиран рачунарским програмом достављеним уз кит и резултати је престављени након нормализације добијених вредности са вредношћу контролног узорка.

### 3.10. Одређивање количине течности у мозгу мерењем мокро-суве тежине

Мерење садржаја течности у мозгу даје нам параметар величине едема након *in vivo* експеримената. Укратко: Након исхемије мозга лабораторијских животиња методом оклузије средње мождане артерије интралуминалним филаментом у трајању од 45

минута и реперфузије од 24 часа животињама је након декапитације узет мозак. Одмах након узимања ткива мозак је подељен на ипсилатералну хемисферу, контралатералну хемисферу и церебелум. Церебелум је касније коришћен као интерна контрола. Након тога узорци су мерени на аналитичкој ваги чиме је добијена мокра тежина ткива (WW). Затим је ткиво стављено на алуминијумску фолију у суву пећницу на 100 °C у трајању од 24 сата како би се сушењем добила тежина суве материје узорака (DW). Садржај течности у мозгу је израчунат из формуле:

$$\text{Садржај течности \%} = \frac{[(WW - DW)]}{WW} \times 100$$

### 3.11. *Мерење величине инфаркта мозга тетразолиум методом*

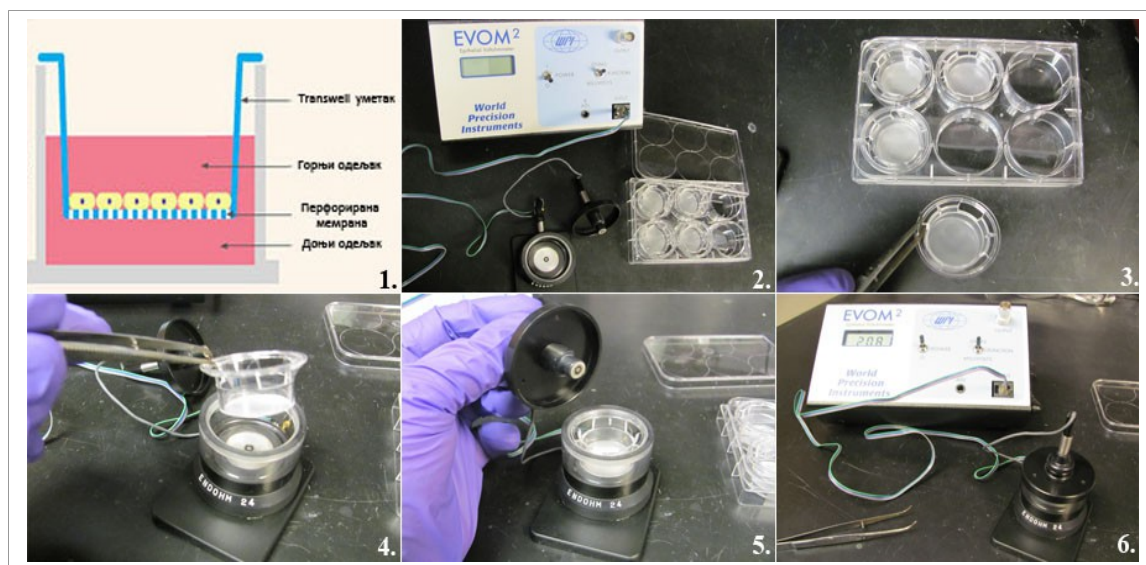
Мерење инфаркта мозга након исхемије 2,3,5-трифенилтетразолиум хлоридом (ТТС) је једна од најчешће коришћених хистохемијских метода за макроскопску идентификацију инфаркта ткива. Сама метода се базира на оксидацији трифенилтетразолиум хлорида митохондријалним ензимом, дехидрогеназом, у интактном ткиву стварајућу црвени продукт формазан. У инфарктном ткиву нема ензима дехидрогеназе па самим тим не долази до настајања црвеног формазана и ткиво остаје необојено. За бојење пресека ткива је коришћен 2% трифенилтетразолиум хлорид (Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.) растворен у фосфатном пуферу (PBS 1X; Gibco Invitrogen Corporation, NY, U.S.A.). Раствор је направљен свеж и чуван у боци захтићен од директног светла.

Након *in vivo* експеримената мишевима је у дубокој анестезији урађена декапитација и узет мозак за ТТС бојење. Након вађења мозак је опран у ледено хладном фосфатном пуферу (1-4 °C) и постављен у калуп за сечење. Прављени су коронарни пресеци дебљине 2 mm почевши од фронталног пола мозга. Сваки пресек је након сечења пребачен у петријеву шољу и потопљен у 2% ТТС где су остављени да се инкубирају 20 минута на 37 °C заштићени од светла. Након завршене инкубације сваки пресек је опран фосфатним пуфером и фиксиран помоћу 10% формалина у трајању од 20 минута. По завршетку фиксације пресеци су пребачени по редоследу сечења на стаклену плочицу и скенирани (Scanjet 4C, Hewlett-Packard) скенером повезаним за рачунар. Сlike су обрађиване рачунарским програмом Image J (Image J, NIH). Тотална величина инфаркта (mm<sup>3</sup>) је добијена сабирањем производа величине инфаркта (mm<sup>2</sup>)

сваког пресека понаособ помноженог са дебљином пресека (2 mm).

### 3.12. Мерење трансендотелијалне електричне резистенце (TEEP)

Трансендотелијална електрична резистенца даје нам одличан увид у конфлуентност и представља добар параметар који корелира са пропустљивошћу монолејера ендотелних ћелија. Смањење електричне резистенце је повезано са повећаном пропустљивошћу монолејера ћелија и представља laku и брзу методу за испитивање пропустљивости ендотелних ћелија у *in vitro* студији.



Слика 6. Метода мерења трансендотелне резистенце конфлуентних ендотелних ћелија помоћу трансендотелног волтметра EVOM2, World Precision Instruments, Inc.

Укратко: ћелије су засађене на уметак са перфорираном поликарбонатном мембраном са порама од  $0.4 \mu\text{m}$ , пречника  $24 \text{ mm}$  и површином од  $4.67 \text{ cm}^2$  и стављен у посуду за ћелијску културу са 6 поља (Colstar 3412, Corning Inc, USA) Тако засађене ћелије су одржаване у пуном медијуму до постизања конфлуентности у инкубатору на  $37^\circ \text{ C}$ , 10% угљен диоксида и 96% влажношћу. Иницијални број ћелија коришћен приликом засађивања био је  $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ . Након постигнуте конфлуентности ћелије су изложене кисеонично глукозној депривацији у аноксичној комори по већ описаном моделу. Након вађења из аноксичне коморе ћелије су опране фосфатним пуфером и стављене у инкубатор на  $37^\circ \text{ C}$ , при концентрацији  $\text{CO}_2$  од 10% (v/v) у основном медијуму који садржи глукозу  $4.5 \text{ g/l}$  (DMEM; Invitrogen Corporation, NY, U.S.A.) стим да је у плочу око уметка додато  $2.6 \text{ ml}$  а у уметак  $1.5 \text{ ml}$  медијума како би притисан на мембрани са обе стране био подједнак. Реперфузија ћелија у условима нормалне сатурације



кисеоником и у медијуму са глукозом трајала је 24 часа стим да је ТЕЕР мерена након 3h, 6h, 12h и 24h од почетка реперфузије. За мерење ТЕЕР користио се трансендотелног волтетар (EVOM2, World Precision Instruments, Inc.) повезан са комором са електродама направљеном да одговара величини уметка од 24 mm (EndOhm-24-World Precision Instruments, Inc). За свако мерење уметак се пребацивао из плоче у комору са електродама где је такође додавано у комору око уметка 2.6 ml а у уметак 1.5 ml основног медијума без серума како би притисак на мембрани са ћелијама са обе стране био подједнак. Рађена су три узастопна мерења након чега је узимана њихова средња вредност. Разлика између три узастопна мерења је била  $\pm 1$ . Такође је мерена електрична резистенција празног уметка без ћелија (бланк). Након завршетка мерења свих група приступило се рачунању ТЕЕР. Од сваке вредности резистенце добијене мерењем експерименталних група се одузимала вредност резистенце празне поликарбонатне мембране добијене мерењем празног уметка након чега се добијена вредност множила са површином мембране. Добијене вредности су изражене у  $\Omega/\text{cm}^2$ .

$$\text{ТЕЕР } \Omega/\text{cm}^2 = (\text{ТЕЕР узорка}(\Omega) - \text{ТЕЕР бланк}(\Omega)) \times P \text{ мембране}(\text{cm}^2)$$

### 3.13. Одређивање неуролошког статуса животиња

Неуролошки скор сваке животиње је пажљиво одређиван 24h након хируршке интервенције сетом неуролошких тестова. Коришћена је скала од 0-4 како би се градирано неуролошко ошећење заостало након 24h од почетка реперфузије.

Миш се пажљиво ухвати за крај репа и лагано подигне за једну дужину изнад површине. По подизању обсервира се флексија предњих екстремитета животиње. Животиње без исхемије мозга врше екстензију оба екстремитета у правцу површине и пошто немају обсервираних других неуролошких дефицита сврставају се у групу 0. Мишеви са можданом исхемијом константно држе предњи контралатералан екстремитет у флексији. Положај флексије варира од благе флексије ручног зглоба са аддукцијом рамена и екстенијом лакта до тоталне флексије ручног зглоба и лакта са аддукцијом и унутрашњом ротацијом рамена. Мишеви са било којим степеном флексије предњег контралатералног екстремитета и без осталих неуролошких знакова сврстани су у групу 1.

Следећи тест је извођен након постављања миша на памучној подлози. Лагано се држи

за реп и другом руком врши латерални притисак иза рамена све док предњи екстремитети не клизну 5-6 cm у супротну страну. Поступак се понавља неколико пута са обе стране. Нормално се мишеви без неуролошког оштећења или са благим неуролошким оштећењем опиру латералном клизању у оба правца. Мишеви са озбиљним неуролошким оштећењем показују тотално одсуство или слабо опирање клизању узрокованом притиском са контралатералне паретичне стране и они се сврставају у групу 2. Последњи тест у низу се изводи полагањем миша на површину и праћењем његовог слободног кретања. Мишеви са тешким неуролошким оштећењем самостално се окрећу у круг са смером кретањем према паретичној страни и они се сврставају у групу 3. Флексија предњег контралатералног екстремитета се увек виђа код животиња код којих је присутно слабо опирање латералном гурању. Оба ова знака су увек присутна код животиња код којих је забележено самостално кружно кретање. У градус 4 сврстане су животиње без спонтане локомоторне активности.

<b>Одређивање неуролошког статуса након експерименталног мишијег модела можданог удара</b>		
<b>Без неуролошког налаза</b>	група 0	Без опсервираних неуролошких знакова
<b>Благо неуролошко оштећење</b>	група 1	Флексија предњег контралатералног екстремитета
<b>Средње тешко неуролошко оштећење</b>	група 2	Смањен отпор латералном клизању (са флексијом предњег екстремитета)
<b>Тешко неуролошко оштећење</b>	група 3	Спонтано кружно кретање (са знаковима из групе 2)
<b>Веома тешко неуролошко оштећење</b>	група 4	Без спонтаних локомоторних активности

Табела 2. Одређивање неуролошког статуса експерименталних животиња након модела исхемичног можданог удара.

#### 4. Резултати

##### 4.1. Антиинфламаторно дејство спиронолактона на *Bend.3* мишије ендотелне ћелије

*мозга након исхемично реперфузионог оштећења.*

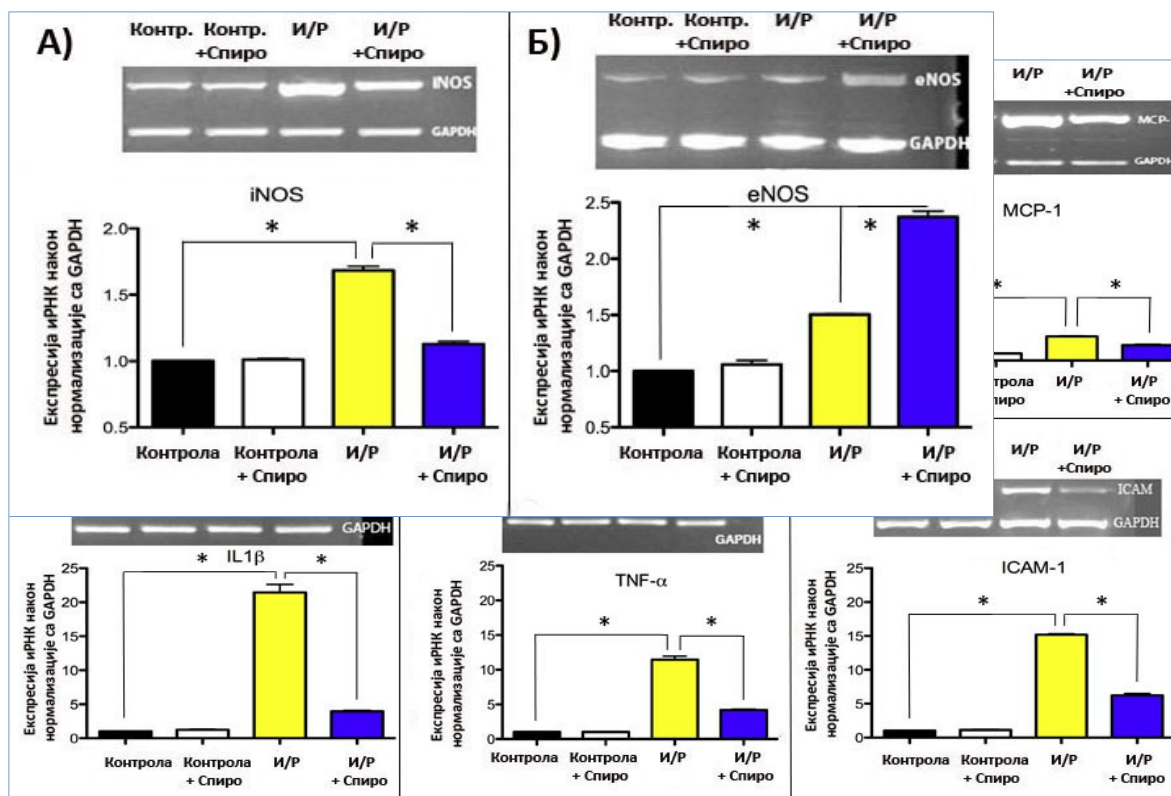
Ендотелне ћелије мозга имају веома јак и брз инфламаторни одговор на исхемично реперфузијоно оштећење како на генском тако и на протеинском нивоу. У циљу испитивања антиинфламаторног дејства спиронолактона на ендотелне ћелије мозга након исхемично реперфузионог оштећења, користили смо предхоно изложене Bend.3 ћелије кисеонично глукозној депривацији у аноксичној комори у трајању од 5 сати са реперфузијом од 24 сата. Након реперфузије одређивали смо антиинфламаторни ефекат 5 $\mu$ M спиронолактона на генском и протеинском нивоу.

*4.1.1. Дејство спиронолактона на генску експресију код Bend.3 мишијих ендотелних ћелије мозга након исхемично реперфузионог оштећења.*

Исхемија-реперфузија представља јак сигнал за транскрипцију информационих РНК за цитокине. Антиинфламаторна дејство спиронолактона на генску експресију мишијих ендотелних ћелија мозга одређивано је семиквантитативном анализом количине информационе РНК за цитокине: TNF- $\alpha$ , IL6, MCP-1, IL1- $\beta$ , CXCL5, и адхезионог молекула ICAM-1 помоћу RT end point PCR анализе.

Три одвојена сета експеримента у којима смо анализирали експресију информационе РНК за наведене инфламаторне медијаторе, показала су њихово значајно смањење код И/Р+Спиро групе у односу на И/Р групу ћелија.

Истовремено није уочен значајан ефекат спиронолактона на њихову синтезу код ћелија из Контрола+Спиро групе. Сам спиронолактон не доводи до промене синтезе ових медијатора. (Слика 7.)



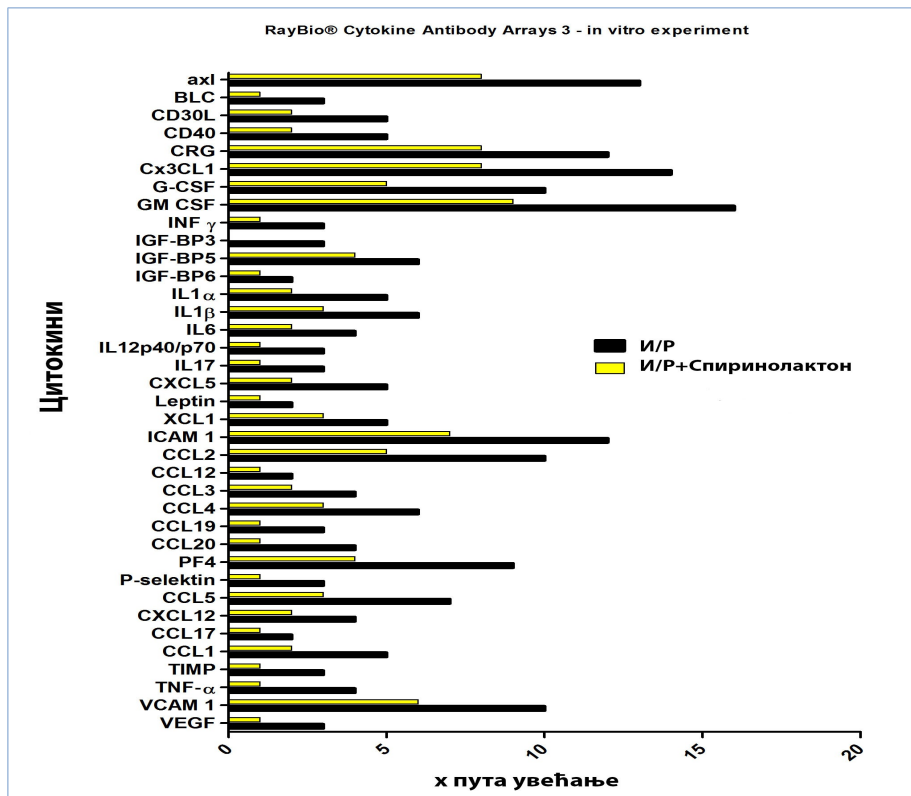
Слика 7. Семиквантитативно одређивање експресије информационе РНК за цитокине А) CXCL5, Б) IL6, В) MCP-1, Г) IL1-β, Д) TNFα и адхезионог молекула Ђ) ICAM-1 помоћу end point RT-PCR методе. Резултати добијени на основу три одвојена сета експеримената представљени су као средње вредности ± стандардна девијација након нормализације са GAPDH интерном контролом. Контрола је представљена вредношћу 1 због лакшег поређења. \*P<0.05 добијена коришћењем ANOVA и post-hoc Bonferroni теста у GraphPad Prism 5 статистичком програму.

Коришћењем исте методе одређивали смо и количину информационе РНК за синтетазе азотних оксида iNOS и eNOS. Ишемија-реперфузија такође представља јак стимулус за репликацију иРНК синтетаза азотних оксида. У три одвојена сета експеримената регистровано је значајно смањење експресије иРНК за iNOS код ћелија из И/Р+Спиринолактон групе у односу на ћелије из И/Р групе. За разлику од iNOS спиринолактон доводи до значајног повећања експресије информационе РНК за eNOS код И/Р+Спиринолактон групе ћелија третираних након реперфузије у односу на ћелије из И/Р групе. Такође није уочен значајан ефекат спиринолактона на њихову синтезу код контролне групе ћелија. (Слика 8.)

Слика 8. Семиквантитативно одређивање експресије информационе РНК за синтетазе азотних оксида А) iNOS Б) eNOS помоћу end point RT-PCR методе. Резултати добијени на основу три одвојена сета експеримената представљени су као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација након нормализације са GAPDH интерном контролом. Контрола је представљена вредношћу 1 због лакшег поређења \*P<0.05 добијена коришћењем ANOVA и post-hoc Bonferroni теста у GraphPad Prism 5 статистичком програму.

#### 4.1.2. Антиинфламаторно дејство спиронолактона на протеинску експресију код *Bend.3* мишијих ендотелних ћелија мозга након исхемично реперфузионог оштећења

Дејство спиронолактона на протеинском нивоу одређивали смо коришћењем комерцијалног кита за одређивање 62 различита цитокина, адхезионих молекула и хемокина (RayBio Mouse Citokine Antibody Array 3), укључених у инфламаторни одговор ендотелних ћелија на исхемију-реперфузију. Кит је коришћен за квалификацију инфламаторног одговора мишијих ендотелних ћелија мозга након *in vitro* модела кисеонично глукозне депривације код ћелија са или без третмана 5 $\mu$ M спиронолактоном на почетку реперфузије. Разлика у експресији са статистичком значајношћу је регистрована код 37 различитих медијатора инфламације. Кисеонично-глукозна депривација у групи И/Р снажно повећава продукцију наведених инфламаторних медијатора.

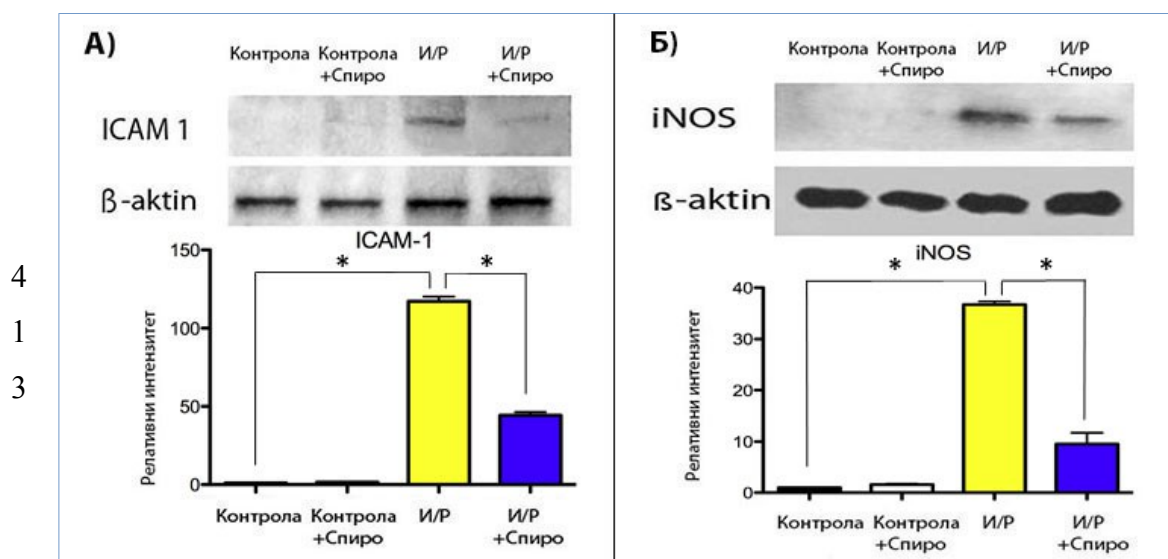


Слика 9. Анализа 62 различита цитокина, адхезионих молекула и хемокина је рађена је помоћу кита RayBio Mouse Cytokine Antibody Array 3. Резултати су представљени након нормализације сваког појединачног узорка са вредностима добијеним у контролној групи. Приказане разлике у експресији 37 инфламаторних медијатора су статистички значајне. ( $P < 0.05$ ).

Код И/Р+Спиро рупе ћелија третираних 5 $\mu$ М спиронолактоном на почетку реперфузије примећено је значајно смањење продукције инфламаторних медијатора у односу на ћелије без третмана. Уочено смањење инфламаторних медијатора креће се од 2 до 5 пута код ћелија третираних 5 $\mu$ М спиронолактоном на почетку реперфузије у односу на оне без третмана (Слика 9). Није примећен никакав утицај третмана спиронолактоном на експресију инфламаторних медијатора код ћелије из Контрол+Спиро групе.

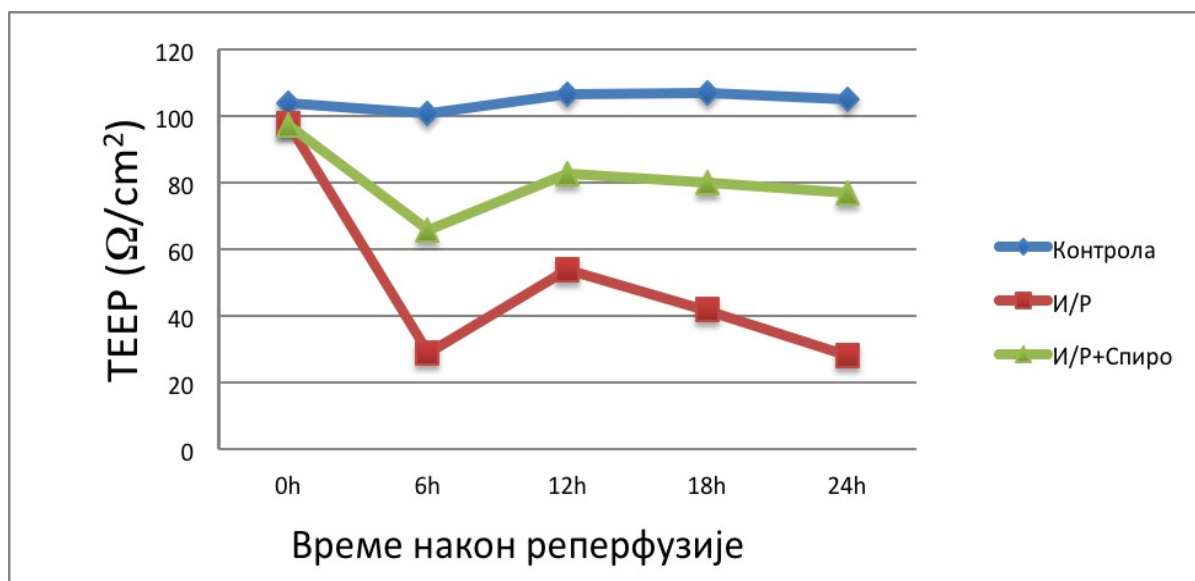
Као додатну потврду повољног дејства спиронолактона на исхемично реперфузионо оштећење на протеинском нивоу, урадили смо имуноблотинг протеина методом Western blot специфичним антителима за адхезиони молекул ICAM-1 и синтетазу азотних оксида iNOS након *in vitro* експеримената. Резултати представљају потврду њихове смањене синтезе на генском нивоу јер смо у три поновљена сета експеримената регистровали три пута мању синтезу адхезионог молекула ICAM-1 и синтетазе азотног оксида iNOS код И/Р+Спиро групе ћелија у односу на И/Р групу ћелија. Сам третман истом концентрацијом спиронолактона на ћелије у Контрол+Спиро групи не доводи до

значајне промене у синтези ових протеина у односу на Контролну групу (Слика 10.).



*Утицај спиронолактона на промену трансендотелне резистенце код Bend.3 мишијих ендотелних ћелија након исхемично реперфузионог оштећења*

Мерењем трансендотелне резистенце (ТЕЕР) код монолејера конфлуентних Bend.3 ћелија након реперфузије уочен је знатно већи пад резистенце код И/Р групе ћелија, којима није дат спиронолактон на почетку реперфузије од ћелија третираних овим леком из И/Р+Спиро групе. Праћена је промена трансендотелне резистенце у трајању од 24 часа мерењем електричног отпора на сваких 6 сати. Највећи пад резистенце примећен је након 6 сати од почетка реперфузије након чега је следио благи опоравак и пораст резистенце. Разлика резистенце након првих 6 сати, када је и забележен њен највећи пад, је била два пута већа у И/Р+Спиро групи од ћелија из И/Р групе. Такође је уочена значајна разлика у резистенци у свим мереним временским интервалима између ових група. Измерена је константно већа резистенца код ћелија из И/Р+Спиро групе која се кретала од два до три пута у односу на групу И/Р. Резултат је добијен након три одвојена сета експеримената (Слика 11.). Трансендотелна резистенца Контрол+Спиро групе које нису излагане кисеонично глукозној депривацији а третиране 5 $\mu$ M спиронолактоном нису показале значајну промену резистенце. Резултат није приказан.



Слика 11. Мерење трансендотелне резистенце конфлуентних Bend.3 ћелија предходно изложених кисеонично глукозној депривацији са или без третмана 5 $\mu$ M спиронолактоном. Разлике у резистенци између група добијених мерењем након сваког временског интервала имају статистичку значајност  $P < 0.05$  добијене коришћењем ANOVA и post-hoc Bonferroni теста у GraphPad Prism 5 статистичком програму.

#### 4.2. Антиинфламаторно дејство спиронолактона на исхемично реперфузионо оштећење мозга код C5BL6 мишева.

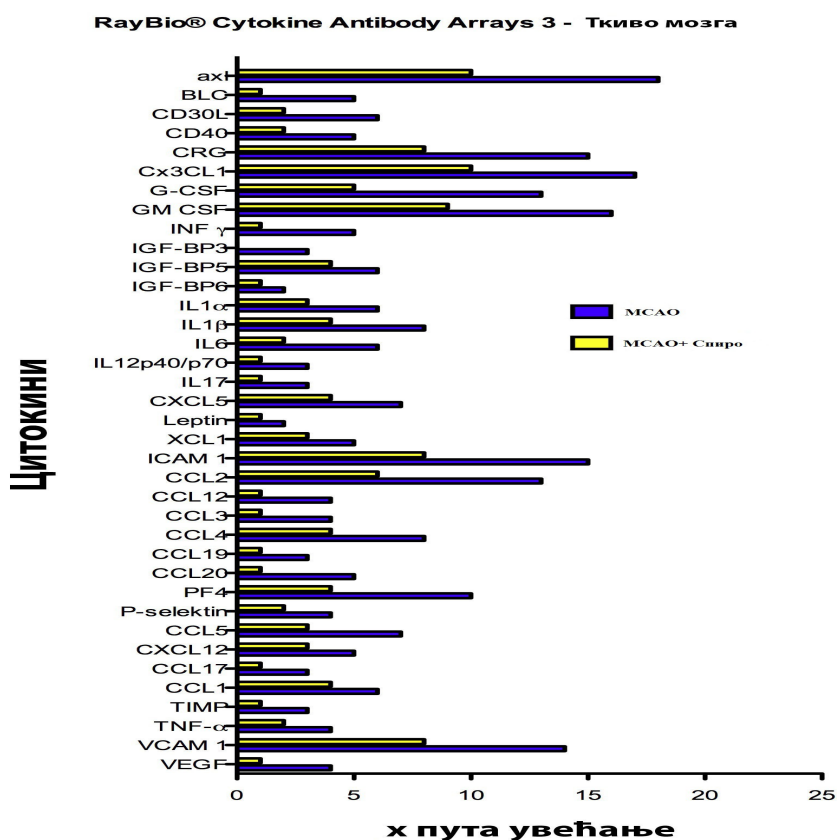
У циљу даљег испитивања антиинфламаторног дејства спиронолактона добијених у *in vitro* експериментима на Bend.3 ћелијама урадили смо читав низ експеримената на мушким јединкама C5BL6 мишева са циљем испитивања антиинфламаторног дејства овог лека у *in vivo* условима након исхемично-реперфузионог оштећења мозга. Као модел možданог удара користили смо оклузију средње možдане артерије интерлуминалним филаментом у трајању од 45 минута након чега је филамент извучен чиме је омогућена реперфузија ткива мозга у трајању од 24 часа. Вршили смо поређење инфламаторног фенотипа код група са и без третмана спиронолактоном у дози 1mg/kg/дневно на почетку реперфузије као и у односу на контролне групе животиња без изазване исхемије мозга.

##### 4.2.1. Дејство спиронолактона на синтезу инфламаторних медијатора код исхемично реперфузионог оштећења мозга C5BL6 мишева.

Као скрининг инфламаторног одговора ткива мозга на исхемично реперфузионо оштећење и утицај спиронолактона на њега, користили смо комерцијални кит за



одређивање 62 различита цитокина, адхезионих молекула и хемокина (RayBio Mouse Cytokine Antibody Array 3) из лизата ткива након 24 сата од реперфузије. Ишемија и реперфузија мозга представља веома снажан окидач за инфламацију. Третман спиронолактоном у дози 1mg/kg/дневно на почетку реперфузије довео је до значајног смањења синтезе 37 тестираних цитокина, адхезионих молекула и хемокина.

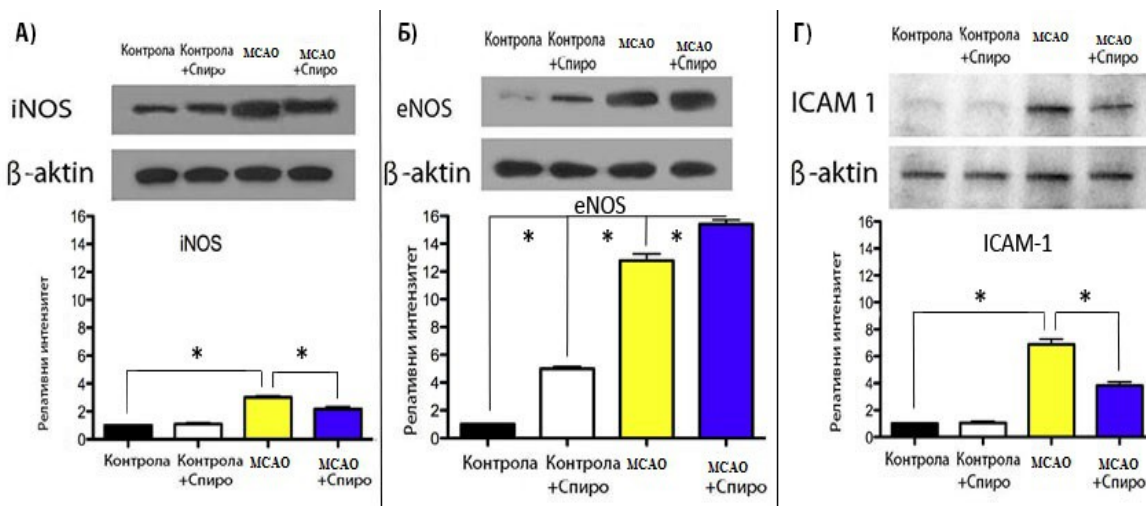


Слика 12. Анализа 62 различита цитокина, адхезионих молекула и хемокина је рађена је помоћу кита RayBio Mouse Cytokine Antibody Array 3 у *in vivo* експериментима. Резултати су представљени након нормализације сваког појединачног узорка са вредностима добијеним у контролној групи. Приказане разлике у експресији 37 инфламаторних медијатора су статистички значајне.

Смањење експресије наведених инфламаторних медијатора код МСАО+Спиро групе мишева кретало се од два до пет пута у односу на МСАО групу животиња. Сам третман спиронолактоном код групе животиња која није подвргнута исхемично-реперфузијом оштећењу мозга није довео до промене у синтези тестираних медијатора. Њихов ниво се није разликовао од нивоа у контролној групи животиња. Резултати су приказани након нормализације са вредностима добијеним у контролној групи. (Слика 12.)

За даљу анализу антиинфламаторног дејства спиронолактона урадили смо додатни сет

експеримената како би се методом имуноблотинга Western blot специфичним антителима испитао утицај спиронолактона на синтезу синтетаза азотних оксида iNOS и eNOS као и адхезионог молекула ICAM-1 код *in vivo* експеримената. Анализом добијених података уочена је знатно мања синтеза адхезионог ммолекула ICAM-1 и синтетаза азотних оксида iNOS код MCAO+Спиро групе мишева.

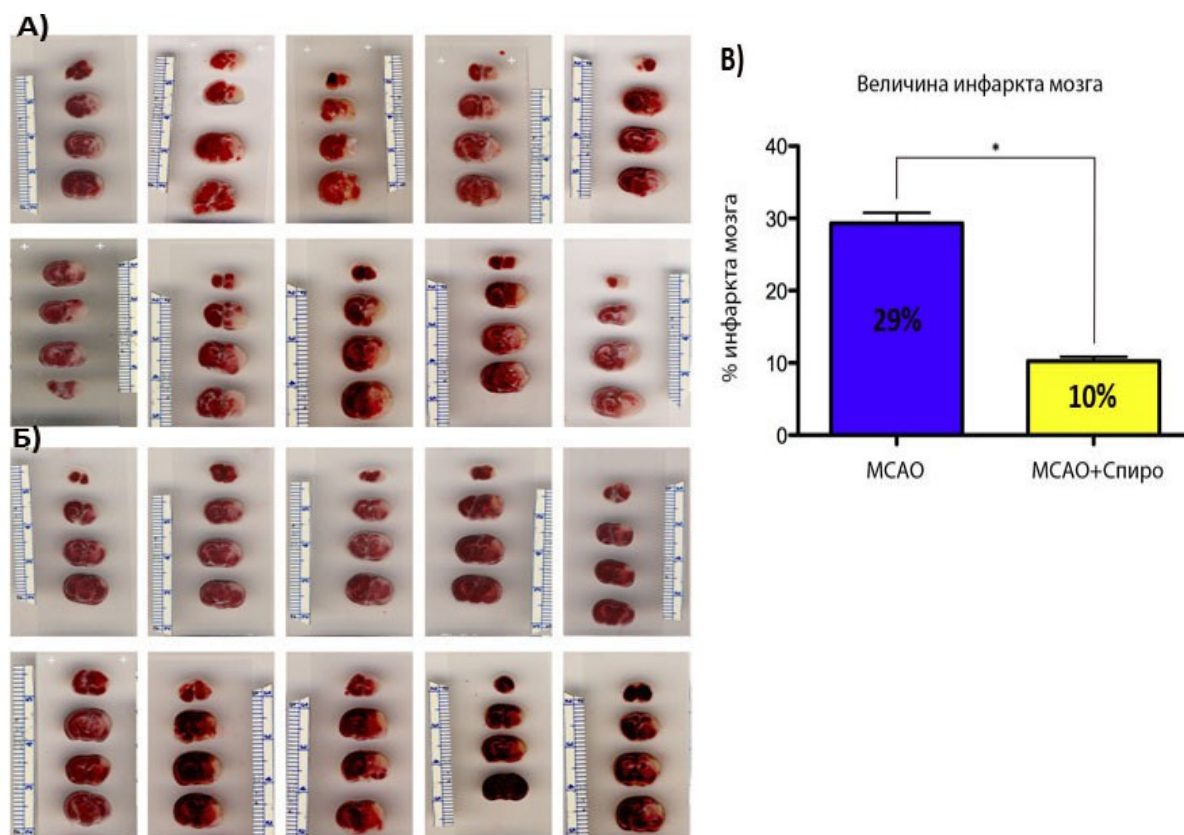


Слика 13. Western blot анализа након *in vivo* експеримената А) азотни оксид синтетаза iNOS, Б) азотни оксид синтетаза eNOS Г) адхезиони молекул ICAM-1. Резултат представља релативни интензитет средњих вредности  $\pm$  стандардна девијација три одвојена сета експеримената приказаних након нормализације  $\beta$  актин-ом. Контрола је представљена вредношћу 1 због лакшег поређења \* $P < 0.05$  добијена коришћењем ANOVA и post-hoc Bonferroni теста у GraphPad Prism 5 статистичком програму.

Уочена је 50% мања синтеза ових протеина код MCAO+Спиро групе животиња у односу на MCAO групу животиња. За разлику од ICAM-1 и iNOS где спиронолактон доводи до инхибиције њихове синтезе третман овим леком је довео до значајног повећања синтезе eNOS код MCAO+Спиро групе животиња у односу на MCAO групу. Такође је примећен утицај овог лека у истој концентрацији на животиње из Контрол+Спиро групе где је довео до повећане синтезе синтетаза азотног оксида eNOS у односу на Контрол групу. Третман спиронолактоном код контролне групе животиња је довео до повећане синтезе синтетаза азотног оксида eNOS. (Слика 13.)

#### 4.2.2. Утицај спиронолактона на величину инфаркта мозга након *in vivo* модела можданог удара код C5BL6 мишева.

У циљу испитивања утицаја спиронолактона на оштећење мозга након транзијентне оклузије средње моздане артерије прво смо испитали његов утицај на величину инфаркта мозга. Након исхемије мозга изазване интралуминалном оклузијом средње моздане артерије и реперфузијом од 24 часа урађени су пресеци ткива мозга и офарбани помоћу 2,3,5-трифенилтетразолијум хлорида. Мерењем величине инфаркта на офарбаним пресецима ткива мозга уочили смо значајно смањење величине инфаркта код МСАО+Спиро групе животиња у односу на МСАО групу. Анализирајући дистрибуцију



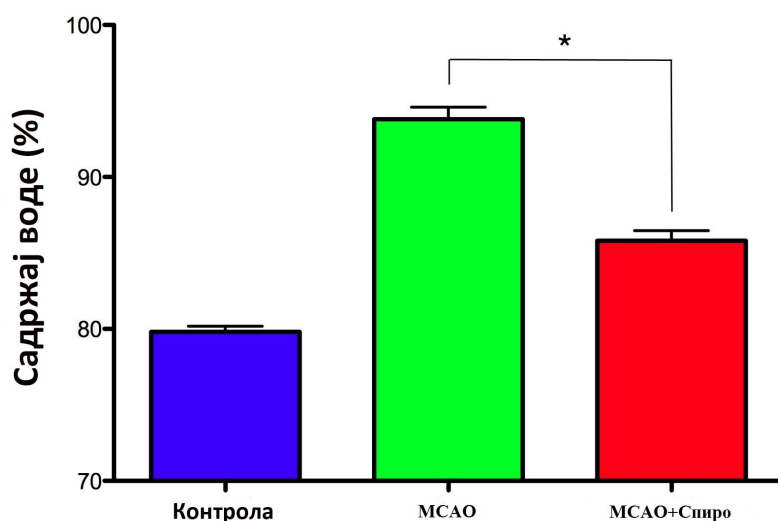
Слика 14. Одређивање величине инфаркта мозга након транзијентне исхемије средње моздане артерије код C5BL6 мишева методом ТТС бојења пресека ткива. А) МСАО група животиња Б) МСАО+Спиро група животиња В) Процент инфаркта мозга код МСАО и МСАО+Спиро групе. \*P<0.05 добијена коришћењем Student t testa.

инфаркта приметили смо да су сви инфаркти код МСАО групе били кортикално-стријаталне локализације док су код МСАО+Спиро групе били локализовани претежно кортикално. Процент мозга захваћеног инфарктом код МСАО+Спиро групе био је

10,26%±0,5 за разлику од МСАО групе животиња где је измерена готово три пута већа површина мозга захваћена инфарктом од 29,32%±1,4. Резултати су добијени на основу анализирања величине инфаркта мозга код 10 животиња из сваке групе. (Слика 14.).

#### 4.2.3. Утицај спиронолактона на пропустљивост крвно-моздане баријере код исхемично реперфузног оштећења мозга C5BL6 мишева

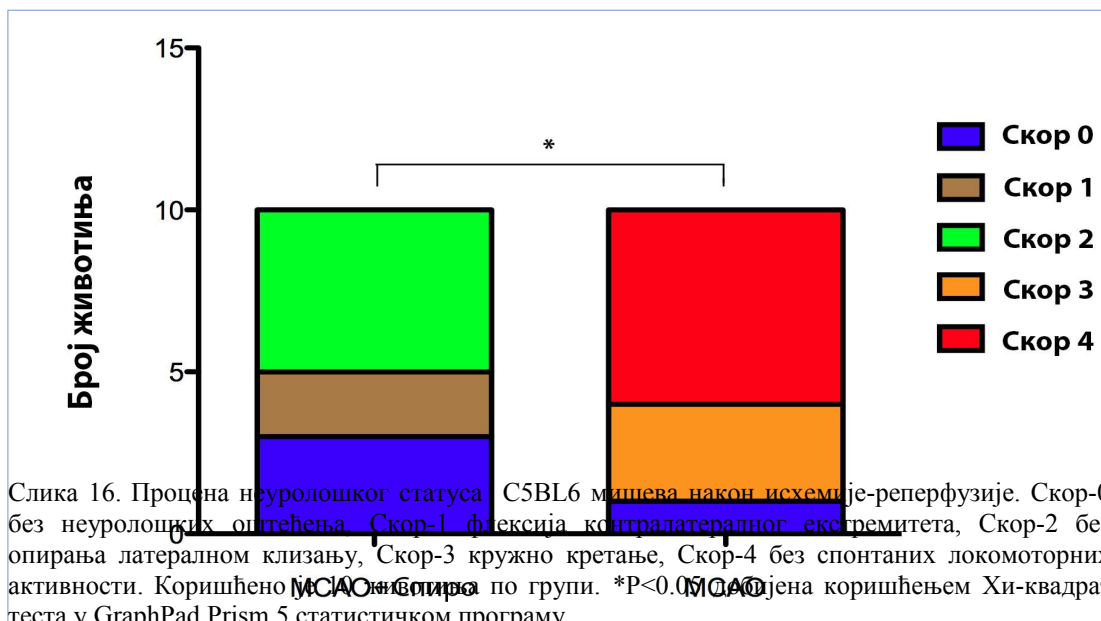
У циљу испитивања како антиинфламаторни ефекат спиронолактона на ендотелне ћелије утиче на пропустљивост крвно-моздане баријере код C5BL6 мишева, мерили смо количину течности у ткиву мозга мокро-сувом методом мерења тежине ткива 24 часа након реперфузије. Процент течности измерен овом методом код И/Р групе животиња је био 93,8% ± 1,7 док је код И/Р+Спиро групе измерена знатно мања количина течности од 85,8% ± 1,4. Вредности измерене код контролне групе животиња које нису подвргнуте исхемији-реперфузији је 79,8% ± 0,8. Резултат је добијен на основу узорка од 10 животиња по свакој групи. (Слика 15.)



Слика 15. Садржај воде у ткиву мозга мерен мокро сувом методом мерења тежине ткива. Контрола животиње са садржајем воде у мозгу од 79,8% И/Р животиње са измереним садржајем воде од 93,8%, И/Р+Спиро животиње са измереним садржајем воде у мозгу од 85,8%. Узорак добијен на основу 10 животиња по групи. \*P<0.05 добијена коришћењем ANOVA и post-hoc Bonferroni теста у GraphPad Prism 5 статистичком програму.

#### 4.2.4. Процена утицаја третмана спиронолактона на неуролошко оштећење код C5BL6 мишева након исхемије-реперфузије

За процену неуролошког статуса након излагања транзијентној исхемији средње мождане артерије C5BL6 мишева користили смо низ прегледа прилагођених животињама. Неуролошки скор сваке животиње је пажљиво одређиван 24h након хируршке интервенције. Коришћена је скала од 0-4 како би се градирано неуролошко оштећење заостало након 24h од почетка реперфузије. Градус 0 означава животиње без знакова неуролошког оштећења, градус 1 животиње са било којим степеном флексије контралатералног екстремитета, градус 2 животиње које се не опирају латералном клизању гурањем контралатералне стране тела уз присуство знака градус 1, градус 3 животиње поред наведених знакова из прве две групе показују и самостално кретање у круг са смером кретања према паретичној страни, градус 4 животиње без спонтане локомоторне активности.

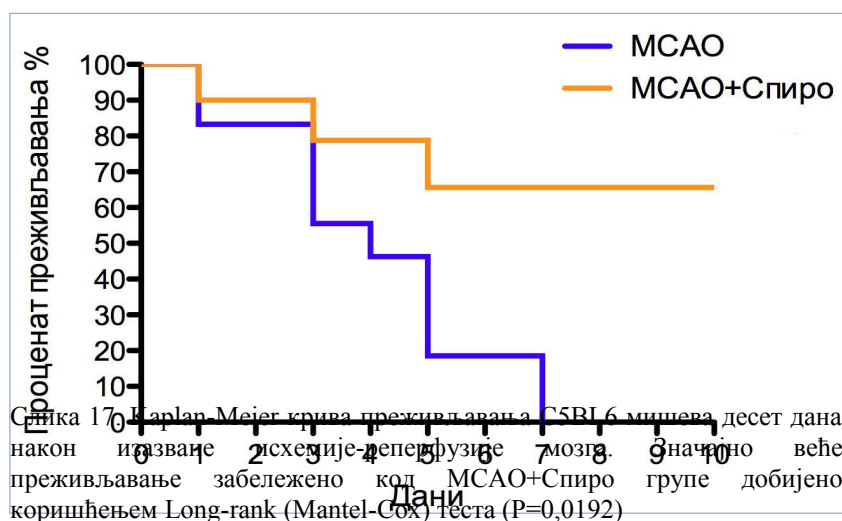


Тестиране животиње којима након реперфузије није дат спиронолактон имали су знатно теже неуролошко оштећење од животиња које су третиране овим леком након реперфузије. Код групе животиња без третмана у градус 4 сврстано је 60% тестираних животиња, 30% њих имало је градус 3 док је само 10% сврстано у градус 0. За разлику од њих животиње третиране спиронолактоном након реперфузије показале су знатно

блажа неуролошка оштећења где је 50% сврстано у градус 2, 20% са градусом 1 и 30% животиња са градусом 0 (Слика 16.).

#### 4.2.5. Утицај спиронолактона на дужину преживљавања C5BL6 мишева након исхемичко-реперфузионог оштећења мозга

Након урађене исхемије методом интралуминалне оклузије средње моздане артерије пратили смо разлике у преживљавању десет мишева са или без третмана спиронолактоном након реперфузије. Након десет дана праћења уочили смо знатно боље преживљавање животиња којима је дат спиронолактон 1mg/kg/дневно одмах након реперфузије од животиња који нису примале овај лек. У групи MCAO+Спиро седам животиња је преживело десет дана од интервенције док је у групи MCAO најдуже забележено преживљавање било седам дана (Слика 17). Животиње које су примале спиронолактон имале су четири пута веће шансе да преживе десет дана након интервенције од животиња без третмана (Hazard ratio = 4,291).

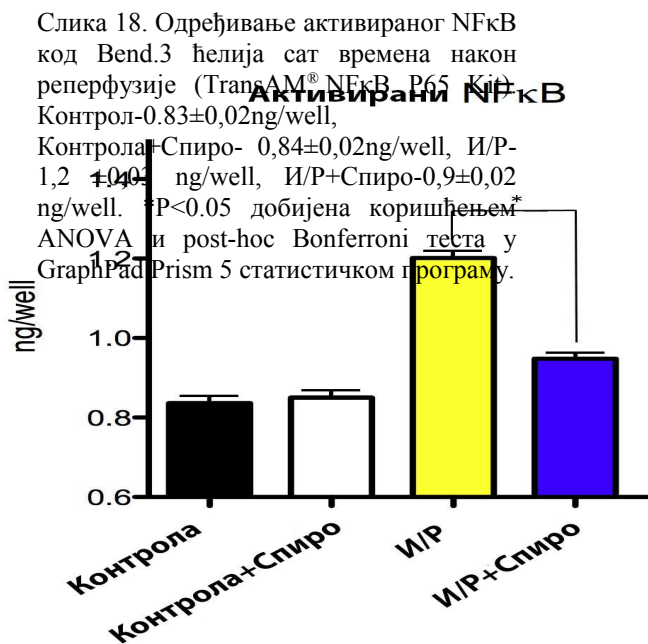


#### 4.3. Антиинфламаторно дејство спиронолактона посредствано је стабилизацијом NFκB транскрипционог фактора

Транскрипциони фактор NFκB представља један од најважнијих фактора у инфламацији. Његова активација и транслокација у једро доводи до синтезе многих инфламаторних медијатора. Утицај спиронолактона на стабилизацију овог транскрипционог фактора проверили смо низом *in vitro* експеримената на Bend.3 ћелијама.

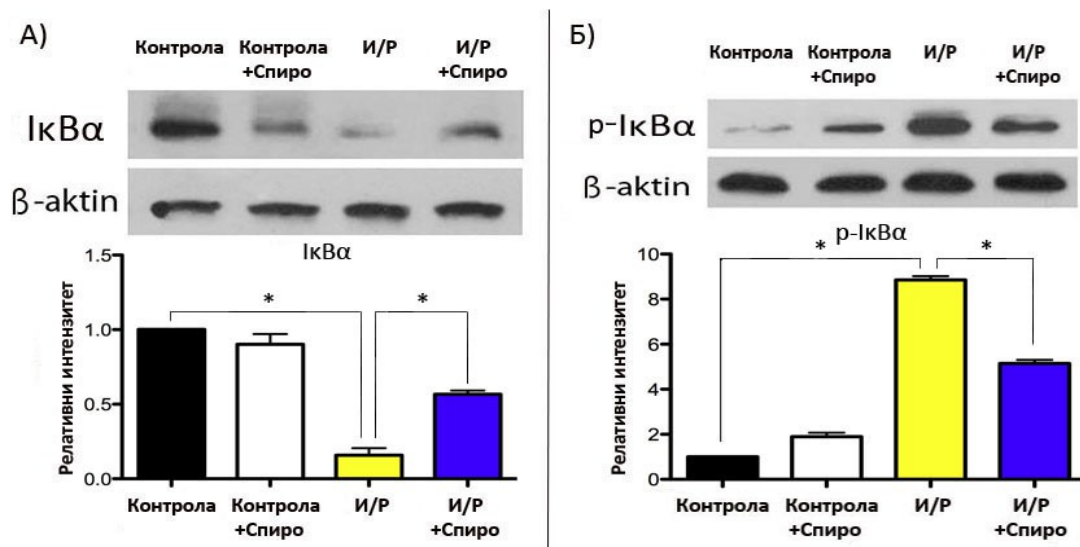
#### 4.3.1. Одређивање активираниог NFκB транскрипционог фактора

Смањену активацију NFκB комплекса код ћелија третираних спиронолактоном након исхемије-реперфузије проверили смо комерцијално набављеним китом за одређивање активираниог NFκB комплекса сат времена након реперфузије. Анализирајући добијене податке у три одвојена независна експеримента уочили смо значајно мању количину активираниог NFκB код групе ћелија третираних спиронолактоном на почетку реперфузије. Количина активираниог NFκB код И/Р+Спиро групе била је  $0,9 \pm 0,02$  ng/well за разлику од И/Р групе где је добијена концентрација износила  $1,2 \pm 0,03$  ng/well. (Слика 18.) Сам третман спиронолактоном у Контрол+Спиро групи није довео до значајног повешћања активираниог NFκB у односу на контролну групу.



#### 4.3.2. Утицај спиронолактона на стабилизацију IκBα-NFκB комплекса

Утицајем спиронолактона на стабилизацију комплекса IκBα-NFκB код Bend.3 мишјих ендотелних ћелија мозга један сат након реперфузије одређивали смо Western blot методом, специфичним антителима за IκBα и његову фосфорилисану форму p-IκBα. Анализом резултата уочена је знатно већа количина ихибиторног протеина IκBα код И/Р+Спиро групе ћелија третираних спиронолактоном након реперфузије у односу на И/Р групу. Количина IκBα у И/Р+Спиро групи била је три пута већа него код И/Р групе. (Слика 19.А) Мерењем фосфорилације овог ихибиторног протеина активације NFκB у идентичним условима запажена је његова знатно мања фосфорилација код И/Р+Спиро групе у односу на И/Р групу. Уочена је 30% већа фосфорилација IκBα код И/Р групе у односу на И/Р+Спиро групу. (Слика 19.Б) У оба случаја је уочено да спиронолактон додат контролној групи ћелија Контрол+Спиро доводи до одређене фосфорилације IκBα протеина што за основу има и смањену количину IκBα у цитоплазми, али није потврђен никакав инфламаторни потенцијал спиронолактона и повећање инфламаторних медијатора код ове групе ћелија у досадашњим експериментима. Резултати су добијени из три независне серије експеримената.



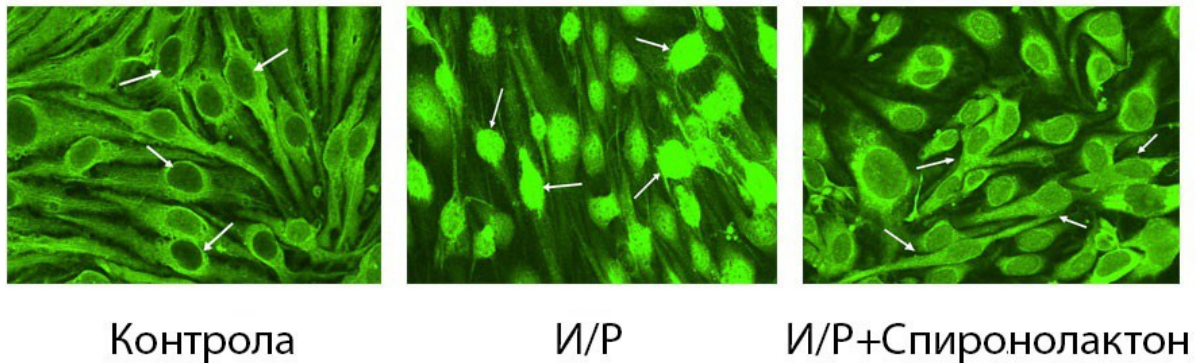
Слика 19. Western blot анализа А) IκBα и Б) p-IκBα. Резултат представља релативни интензитет средњих вредности ± стандардна девијација три одвојена сета експеримената приказаних након нормализације β актин-ом. Контрола је представљена вредношћу 1 због лакшег поређења \*P<0.05 добијена коришћењем ANOVA и post-hoc Bonferroni теста у GraphPad Prism 5 статистичком програму.

#### 4.3.3. Утицај спиронолактона на релокализацију NFκB комплекса у једро код Bend.3 ћелија након исхемије-реперфузије.

Утицај спиронолактона на релокализацију NFκB у једро тестирали смо



имунофлуоресцентним бојењем Bend.3 ћелија сат времена након реперфузије специфичним анти-NFκB антителом обележеним флуоресцеином. Овом методом имали смо директан увид у локализацију NFκB комплекса. Посматрањем овако обележених ћелија помоћу конфокалног микроскопа уочена је знатна разлика у локализацији NFκB комплекса између група. Код контролних ћелија целокупна количина NFκB се налазила у цитоплазми. У И/Р групи ћелија изложених кисеонично глукозној депривацији, као јаком инфламаторном стимулусу, целокупна количина NFκB била је локализована у једру. За разлику од И/Р групе, код ћелија из И/Р+Спиро групе, које су такође изложене кисеонично глукозној депривацији али и третману 5μМ спиронолактоном након реперфузије уочена је знатно мања количина NFκB у једру са претежном цитоплазматском локализацијом овог транскрипционог фактора. (Слика 20.)



Слика 20. Имунофлуоресцентно бојење NFκB комплекса код Bend.3 ендотелних ћелија сат времена након реперфузије. Сlike насумично изабраних видних поља обрађиване у компјутерском програму Adobe Photoshop. Стрелицама су обележена једра ради лакшег поређења локализације NFκB

## 5. Дискусија

### 5.1. Експериментални модели у мозданом удару

Испитивање молекуларних механизма у исхемичном možданом удару у лабораторијским условима захтева одабир доброг експерименталног модела možданог удара. Дobar модел мора што ближе да опонаша услове и механизме који се срећу за време и након možданог удара код људи, да омогући поновљивост, буде што мање инвазиван, што је могуће јефтинији и да омогући лаку евалуацију резултата (11).

У нашој студији за *in vivo* експерименте користили смо транзијентну оклузију средње možдане артерије јер већина исхемичних možданих удара код људи настаје оклузијом средње možдане артерије тако да је адекватан модел морао да задовољи и овај услов.

Сви модели исхемичног možданог удара се могу поделити на две групе: транзијентни и перманентни модел исхемичног možданог удара. У поређењу са перманентном оклузијом средње možдане артерије која имитира само мали проценат исхемичних možданих удара код људи, где не долази до реканализације, транзијентни модел оклузије нам омогућава боље услове за испитивање механизма исхемично реперфузионог оштећења након терапијске или спонтане реканализације.

Модел транзијентне оклузије средње možдане артерије интралуминалним филаментом коришћен у овој студији задовољавао је све наведене критеријуме и представља најраспрострањенији модел исхемичног možданог удара. Овај модел је први пут представљен од стране Koizumi са сарадницима (12) и до данас је претрпео више модификација у циљу побољшања и смањења контраефеката. Изворно модел је први пут описан на пацовима али након малих модификација данас се широко користи и код мишева.

Коришћењем овог модела добија се инфаркт латералног каудопутамена и фронтпаријеталног кортекса. У нашој студији определили смо се да за модел исхемично реперфузионог оштећења мозга користимо мишеве C5BL6 соја. C5BL6 врста мишева је најчешће коришћена у испитивању možданог удара из неколико разлога: васкулатура мозга ових животиња је идентична васкулатури људи, њихова мала величина омогућава лако извођење физиолошких испитивања као и анализу ткива мозга, јефтини су за одржавање и размножавање, имају велику генетску хомогеност, знатно бољу јавну и етичку прихватљивост за коришћење у експериментима него друге животиње.

За разлику од осталих модела који се данас користе у испитивању исхемично-реперфузионог оштећења предности овог модела су што се добија локализована и лако поновљива лезија ткива, не захтева кранијактомију, технички процедура није компликована и не постоји могућност спонтане реканализације.

Међутим и поред сталног унапређења овог модела исхемичног možданог удара за сада не постоји модел код животиња који би савршено одговарао исхемичном možданом удару код људи. Главни недостатци ове методе су потенцијалне разлике у величини инфаркта које зависе од дубине инсерције и дужине трајања оклузије микрофиламентом, могућност руптуре крвног суда и оштећење ендотела филаментом. Смањење могућности јављања ових недостатака захтева добро тренирани персонал. Пошто се оклузија крвног суда врши силиконским интралуминалним филаментом недостатак је то што се потпуно искључује улога тромба у инфламацији на месту оклузије.

И поред свих недостатака ова метода годинама се широко користи и представља добар алат у испитивању možданог удара на животињама.

Избор експерименталног модела за *in vitro* студију бијо је нешто лакши. Најчешће коришћени модел, у *in vitro* условима, за исхемично реперфузијоно оштећење је кисеонично-глукозна депривација у аноксичној комори праћена реоксигенацијом. Овај модел не задовољава све услове у којима се ћелије налазе услед оклузије крвног суда. Излагање ћелија условима аноксије у аноксичној комори у базалном медијуму без глукозе са трајањем од пет сати адекватно опонаша услове услед смањеног допремања кисеоника и глукозе у ткиво мозга у исхемичном možданом удару али не опонаша остале ефекте редукције и рестаурације протока крви у мозгу (13,14). Без обзира на своје недостатке овај модел представља одличан алат за истраживање молекуларних механизма у реперфузијоном оштећењу. Дугогодишња примена овог модела показала је да петочасовно излагање ендотелних ћелија исхемији у аноксичној комори доводи до промена које одговарају променама ендотелних ћелија након možданог удара.

Више од деценије за *in vitro* модел крвно-моздане баријере користиле су се ендотелне ћелије примарно изоловане из капилара мозга (15). Међутим примарне ендотелне ћелије имају своје недостатке који дају предност коришћењу комерцијалних ћелијских линија ендотелних ћелија. Главни недостатак примарних ендотелних ћелија је промена њиховог високо диферентованог фенотима што временски ограничава коришћење ових ћелија. Сама изолација примарне културе ендотелних ћелија са собом носи потенцијалну контаминацију другим типовима ћелија ткива мозга што доводи до повећане пропустљивости *in vitro* модела и захтева високо обучени персонал (16,17). Процес изолације мишићних ендотелних ћелија мозга је веома скуп процес и захтева жртвовање преко четрдесет животиња. Због свега наведеног у нашој студији смо се определили за коришћење комерцијалне ћелијске линије имортализованих мишићних

ендотелних ћелија мозга (Bend.3). Предност ове врсте ћелија у односу на примарно изолованих ћелија је стабилан фенотип након више деоба и релативно јефтино одржавање. У више студија потврђено је да ове ћелије имају све карактеристике специфичне за примарне мишће ендотелне ћелије мозга као што су експресија иРНК и протеина ћелијских спојница (ZO-1, Claudin-5, Claudin-1, Occludin), пермабилитет за сукрозу, трансендотелијална електрична резистенца и постојање транспортера за глукозу. Такође, Bend.3 ћелије имају истоветан инфламаторан одговор на исхемију-реперфузију као и примарне мишће ендотелне ћелије мозга што их је квалификовало за коришћење у овој студији.

## *5.2. Спиринолактон као потенцијална антиинфламаторна терапија за реперфузијоно оштећење*

Церебрална исхемија као и реперфузија покреће серију инфламаторних процеса који воде ка већем оштећењу мозга и тежем функционалном опоравку. Сходно томе антиинфламаторна терапија након можданог удара требало би да доведе до мањег оштећења и бржег опоравка пацијената након исхемичног можданог удара. Међутим, инфламација након можданог удара нема само лоше ефекте заправо хронична инфламација је неопходна за репарационе процесе као што су неоваскуларизација, пластицитет и регенерација. Идеална терапија модулисања инфламаторног одговора након исхемичног можданог удара требала би да се усмери само на инхибицију акутног инфламаторног одговора у првих седам до десет дана како би се спречило оштећење бурном инфламаторном реакцијом услед исхемије-реперфузије мозга, након чега би се омогућио бенефит хроничног инфламаторног процеса. У последњој деценији доста се урадило на самом разумевању инфламације узроковане исхемијом и реперфузијом. Урађено је више студија везаних за инхибицију важних медијатора инфламаторног одговора након исхемије али за сада ни један није заживео у клиничкој пракси. Већина њих је показала веома добре резултате у експерименталном испитивању на животињама, међутим никада нису заживели у клиничкој пракси.

У последње време све веће интересовање влада за антиинфламаторно дејство блокатора минералокортикоидног рецептора. Спиринолактон је лек који је добро познат стручној јавност и испешно се користи још од 1959. године у третману срчане инсуфицијенције и хипертензије. Овај лек је у својој дугогодишњој употреби добро истестиран и познати су сви нежељени ефекти и контраиндикације. Поред до сада

познатих терапијских ефеката спиронолактона у лечењу хипертензије, примарног хипералдостеронизма, срчане инсуфицијенције, хипокалијемije, едематозних стања појавила се и једна нова могућност коришћења ове групе лекова код инфламаторних стања.

Последњих година појавиле су се веома опсежне студије које потврђују антиинфламаторно дејство блокатора минералокортикоидних рецептора. Спинонолактон је показао антиинфламаторни и антифиброзни ефекат у терапији стања након инфаркта миокарда, акутне бубрежне инсуфицијенције, хипертензивне дијабетичне нефропатије и код артритиса. Резултати двеју опсежних студија (EPHESUS, RALES) показали су да мале дозе спиронолактона значајно редукују морбидитет и морталитет код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом индукујући регресију хипертрофије леве срчане коморе, добру контролу крвног притиска и превенцију нових кардиоваскуларних оштећења. У експерименталним студијама показао се веома корисним у превенцији можданог удара код спонтано хипертензивних пацова као и смањење величине инфаркта мозга код мишева са идукованим можданим ударом. Недостатак минералокортикоидног рецептора на макрофазима доводи до смањења постисхемичког инфламаторног одговора као и смањења величине инфаркта мозга након можданог удара. Блокадом минералокортикоидног рецептора помоћу лека Еплеронона довело је до смањења активности Rho-associated kinases (ROCKs) чиме је побољшана функција и смањена инфламација ендотела код пацијената са есенцијалном хипертензијом. Употреба спиронолактона код анкилирајућег спондилитиса смањује инфламацију и побољшава функцију ендотела успоравајући развој атеросклерозе чиме смањује кардиоваскуларни морталитет код ових пацијената (18-29).

Због свих наведених антиинфламаторних ефеката спиронолактона и комплетности антиинфламаторног дејства наметнуо се као потенцијално добар и безбедан избор за третман реперфузионог оштећења након можданог удара у дози од 1mg/kg/дневно Доза коришћена у овој студији на почетку реперфузије нема утицај на крвни притисак а пошто се ради о веома ниској терапијској дози ризик за појаву нежељених ефеката смањен је на минимум.

### *5.2.1. Утицај спиронолактона на инфламаторни одговор мозга код исхемије-реперфузије*

Централни нервни систем представља имуно привилеговани орган заштићен од инфламаторног утицаја из крви посредством постојања крвно моздане баријере која регулише прелазак ћелија имуног система и инфламаторних медијатора из крви у ткиво мозга. У случају мозданог удара када долази до смањеног допремања крви у одређени део мозданог ткива, а последично и до пада концентрације кисеоника и глукозе у ткиву настаје поремећај синтезе високо енергетских молекула. Недостатак енергије доводи до поремећаја функције енергетски зависних процеса у ћелијама неопходних за њихово преживљавање и до њихове некрозе што представља јак окидач за инфламацију.

Терапијска реперфузија као и спонтана реканализација запушеног крвног суда у мозгу отклања узрок настанка мозданог удара али у исто време врши егзацербацију инфламаторног одговора ткива што доводи до стања познатог као реперфузионо оштећење. Неколико патофизиолошких процеса укључено је у развој овог оштећења а најважнија су: акумулација леукоцита, активација тромбоцита и система комплемента, хиперперфузија са капиларном реоклузијом и дезинтеграција крвномоздане баријере. Реперфузионо оштећење се сматра за једног од главних фактора за развој хеморагије као главне компликације терапијске тромболизе. Постоје бројни научни радови који показују постојање реперфузионог оштећења (30-33). Инфламација ткива мозга након исхемије и реперфузије се карактерише активацијом ендотелних ћелија мозга, астроцита, микроглије и експресије инфламаторних медијатора. Инфламација индукује рапидну експресију инфламаторних медијатора-citoкина, хемокина просагландина, који доводе до апрегулације адхезионих молекула, повећавајући пропустљивост крвномоздане баријере што доводи до екстравазације имуних ћелија из крви и ослобађања токсичних молекула у ткиву мозга (6,34-46). Локална секреција хемокина у мозгу доводи посредством хемотаксе неутрофиле и моноците у жариште исхемичне лезије.

Наши резултати су такође показали да исхемија и реперфузија представљају јак стимулус за синтезу citoкина и хемокина у исхемијом захваћеном подручју мозга. Уочено је значајно повећање синтезе инфламаторних медијатора након исхемично реперфузионог оштећења 24 часа након реперфузије код Bend.3 мишијих ендотелних ћелија мозга као и целог ткива мозга C5BL6 мишева. Коришћењем комерицјалног кита (RayBio Mouse Cytokine Antibody Array 3) за одређивање 62 различита citoкина и хемокина уочили смо 2 до чак 19 пута већу синтезу 37 различитих медијатора инфламације у односу на контролу (Слика 9 и Слика 12). Овај резултат представља

потврду јаког стимулативног дејства исхемије-реперфузије на синтезу цитокина и хемокина. Употребом спиронолактона на почетку реперфузије код *in vitro* експеримената на Bend.3 ћелијама (Слика 9.) као и код C5BL6 мишева у *in vivo* експериментима (Слика 12.) добили смо значајно смањење синтезе инфламаторних медијатора код група третираних овим леком.

Смањење синтезе 37 цитокина од 62 укупно тестираних кретало се од 2 до 5 пута у односу на групе без третмана. Овај резултат показује једно широко антиинфламаторно дејство спиронолактона на инфламаторни процес након исхемије и реперфузије.

Поред скрининга 62 различита медијатора инфламације темељније смо обрадили најзначајније и најпроучаваније цитокине TNF- $\alpha$ , IL6, MCP-1, IL1- $\beta$ , CXCL5, хемокине MCP-1 (CCL2) и CXCL5 (ENA-78), адхезиони молекули ICAM-1 и азотне оксиде који су апрегулисани у мозгу као одговор на исхемију и реперфузију и утицај терапије спиронолактоном на њихову синтезу.

Проинфламаторни цитокин TNF- $\alpha$  представља један од најважнијих медијатора неуроинфламације који активира каскаду процеса у ћелији. Повећана синтеза иРНК за TNF- $\alpha$  у кортексу код исхемичних стања мозга је потврђена како код перманентне тако и код транзијентне исхемије на експерименталном моделу можданог удара код пацова (47-49). Повећање синтезе TNF- $\alpha$  након оклузије средње мождане артерије повезано са тежим неуролошким оштећењем и већим инфарктом мозга. Постоји корелација у синтези иРНА за TNF- $\alpha$  са повећаном синтезом IL6 и IL1 чиме заједнички продубљују инфламаторно оштећење након исхемије мозга код пацова (50,51). Иницијално повећање синтезе TNF- $\alpha$  након исхемије мозга се детектује након 1-3 сата након реперфузије са поновним другим пиком синтезе након 24-36 сати (47,52,53). Клиничке студије су такође показале повећану синтезу TNF- $\alpha$  код људи након исхемичног можданог удара (54) где се прво секвенцијално јавља у инфаркту мозга и периинфарктном ткиву па тек касније се може детектовати у контралатералној хемисфери и осталим деловима мозга (55). Концентрација TNF- $\alpha$  у цереброспиналној течности је такође повећана код пацијената са акутном исхемијом мозга како код кортикално локализованих инфаркта тако и код оних са претежном локализацијом у белој маси мозга (56). Такође постоји повећање концентрације овог цитокина у плазми код пацијената са акутним исхемичним можданим ударом (57). Код пацијената са лакунарном исхемијом мозга повећање концентрације TNF- $\alpha$  у плазми представља лош прогностички знак са раним неуролошким поремећајем и slabим функционалним опоравком (58).

Фокална исхемија мозга такође активира повећану синтезу TNF- $\alpha$  рецептора p75 на ендотелним ћелијама мозга микроглији и новоприселим макрофазима. (59-61). Постоји велики број података који показују да повећана синтеза цитокина TNF- $\alpha$  повећава пропустљивост крвно-мождане баријере и самим тим повећава едем и неуролошко оштећење. Посредством овог цитокина долази до реорганизације цитоскелета ендотелних ћелија и међућелијских спојница чиме се повећава парацелуларни транспорт. TNF- $\alpha$  повећава продукцију серин протеаза укључених у дезинтеграцију крвно-мождане баријере, ремоделовање ткива и неуропластичност. (62-65). Група аутора је показала да TNF- $\alpha$  узрокује генску експресију битну за адхезију, трансмиграцију, хемотаксу апоптозу код ендотелних ћелија мозга (66).

Наши резултати дају потврду повећане синтезе информационе РНК за цитокин TNF- $\alpha$  24 часа након реперфузије код BEnd.3 ћелија у *in vitro* условима. Повећање синтезе информационе РНК 24 часа након реперфузије ендотелних ћелија мозга кретеало се 10 пута у односу на контролни узорак (Слика 7.). Повећање синтезе информационе РНК добијено у нашем резултату се поклапа са другим пиком инфламаторне реакције ендотелних ћелија на исхемију-реперфузију.

Овако снажна транскрипцијона активност довела је до повећане синтезе самог цитокина у bEnd.3 ендотелним ћелијама мозга добијеним коришћењем комерцијалног кита за детекцију инфламаторних медијатора 24 часа након реперфузије. Наши резултати су показали да је синтеза овог цитокина код BEnd.3 ендотелних ћелија мозга 24 часа након реперфузије пет пута већа у односу на контролну групу (слика 9). У *in vivo* експериментима смо такође добили четири пута већу синтезу овог цитокина у мозгу мишева 24 часа након оклузије средње мождане артерије у односу на контролну групу (слика 12.). Резултати добијени у овој студији као многи други потврђују круцијалну улогу цитокина TNF- $\alpha$  у исхемично реперфузијом оштећењу мозга.

TNF- $\alpha$  као један од важнијих цитокина био је терапијска мета више студија. Инхибиција TNF- $\alpha$  доводи до смањења исхемичног оштећења мозга (67). TNF- $\alpha$  везујући протеин, као ендогени инхибитор TNF- $\alpha$  сигналног пута настао одсецањем екстраћелијског дела TNF- $\alpha$  рецептора (68) и неутралишуће антитело за TNF- $\alpha$  онемогућује везивање TNF- $\alpha$  за рецептор и покретање сигналног механизма. Третман овим инхибиторима TNF- $\alpha$  дао је повољне резултате на експерименталном нивоу (69,70). Студије на мишевима дефицијентним за TNF- $\alpha$  показале су знатно мање оштећење мозга након исхемије-реперфузије у односу на wild type животиње (71,72). На основу свих досадашњих чињеница о значају цитокина TNF- $\alpha$  и потенцијалног



терапијско дејство његове инхибиције на исхемично-реперфузијоно оштећење мозга испитали смо утицај спиронолактона на његову синтезу након експерименталног модела можданог удара.

Након употребе спиронолактона на почетку реперфузије синтеза информационе РНК за TNF- $\alpha$  код bEnd.3 ћелија 24 часа након реперфузије била је 2,5 пута мања у односу на групу која није третирана овим леком у реперфузији (Слика 7.). Смањење синтезе на транскрипционом нивоу одразило се и на смањење синтезе самог цитокина код ћелија третираних спиронолактоном. Третман спиронолактоном довео је до три пута мање синтезе овог цитокина у односу на групу ћелија без третмана након реперфузије у *in vitro* експериментима (Слика 9.), док је у *in vivo* студији забележена његова дупло мања синтеза код животиња третираних овим леком у поређењу са животиња које нису третиране овим леком на почетку реперфузије (Слика 12.).

Овим резултатима показали смо значајан утицај спиронолактона на смањење синтезе TNF- $\alpha$  као једног од најзначајнијег инфламаторних цитокина укљученог у оштећење ткива мозга након исхемије.

Синтеза IL6 представља важну карику у пропацији инфламаторног одговора након исхемије и реперфузије. Повећање синтезе IL6 у акутној фази можданог удара остаје у пенубри и до 14 дана након можданог удара (73,74). Ћелије способне да синтетишу IL6 у мозгу након исхемије-реперфузије су ендотелне ћелије, неурони и микроглија (75,76). Код пацијената након можданог удара концентрација IL6 у плазми корелира са тежином неуролошког оштећења и слабијим функционалним опоравком (77-79). Клиничка студија у којој је пацијентима са акутним исхемијским можданим ударом дат људски рекомбинантни антагонист рецептора за IL6 имали су знатно блажа неуролошка оштећења и бољи опоравак као и мању концентрацију овог цитокина у плазми (80). У супротности са овим резултатима, неке студије су показале да IL6 има и неуропротективно дејство. Група аутора је показала да IL6 убризган интравентрикуларно доводи до смањења оштећења мозга након перманентне оклузије средње мождане артерије код пацова (81). Постоје претпоставке да повећана синтеза овог цитокина делује антиапоптолично на неуроне активацијом Stat3 транскрипционог фактора (82,83).

Наши резултати су такође показали да исхемија са реперфузијом има јак стимулативни ефекат на синтезу IL6 24 часа након реперфузије. bEnd.3 ћелије изложене исхемији-реперфузији 24 часа након реперфузије показале су више од два пута већу транскрипцију иРНК за IL6 у односу на контролну групу (Слика 7.). Повећање

транскрипције иРНК за IL6 последично је довело и до четири пута веће синтезе овог цитокина код bEnd.3 ћелија 24 часа након реперфузије у поређењу са контролом (Слика 9.). У *in vivo* експериментима наши резултати су показали шест пута већу синтезу IL6 у ткиву мозга животиња изложених оклузији средње мождане артерије 24 часа након реперфузије у односу на контролне животиње без ове интервенције (Слика 12.).

Употребом спиронолактона на почетку реперфузије добили смо знатно смањење транскрипције иРНА за IL6 код bEnd.3 ћелија третираних овим леком у односу на ћелије без третмана (Слика 7.). Утицај спиронолактона на смањење транскрипције довео је и до смањене синтезе самог цитокина. У *in vitro* студији добили смо два пута мању синтезу IL6 код ћелија третираних спиронолактоном у односу на ћелије без третмана овим леком на почетку реперфузије (Слика 9.). У *in vivo* студији на C5BL6 мишевима употреба спиронолактона на почетку реперфузије након оклузије средње мождане артерије довела је до три пута мање синтезе овог цитокина у односу на животиње без третмана овим леком након интервенције (Слика 12.). На основу резултата добијених у овој студији можемо рећи да спиронолактон има веома значајно супресивно дејство на синтезу IL6 као једног од најважнијих цитокина у инфламацији ткива мозга након исхемије-реперфузије.

У здравом ткиву мозга фамилија IL1 цитокина се једва детектују, али њихова експресија рапидно расте у исхемији и реперфузији мозга (84). Ћелије способне да синтетишу IL1 у ткиву мозга као одговор на исхемију су: ендотелне ћелије, микроглија, астроцити и неурони (85). IL1 има две изоформе IL1 $\alpha$  и IL1 $\beta$ . Ове две форме IL1 и ендогени инхибитор рецептора за IL1 су до сада једни од највише испитиваних медијатора инфламације у условима исхемичног можданог удара. IL1 свој ефекат остварује преко две врсте рецептора (тип 1 и тип 2 рецептора). Рецептор типа 1 може се наћи на много врста ћелија и служи за везивање обе форме IL1. Супротно рецептору типа 1 рецептор типа 2 се налази на неутрофилима, Б лимфоцитима и макрофазима и има афинитета само за IL1 $\beta$  (86). Постоје више радова који су показали да исхемија мозга представља стимулус за синтезу IL1 $\beta$  (87,88). Транскрипција иРНК за IL1 $\beta$  након исхемије мозга почиње већ након 15 до 30 минута и након пар сати води повећаној синтези цитокина у ткиву (89,90). Студије на пацовима су показале да синтеза IL1 $\beta$  након исхемије мозга има бифазичан ток са раном секрецијом пар сати након исхемије и као други пик синтезе 16-24 часова након исхемије (91).

Резултати добијени у овој студији такође иду у прилог јаком стимулативном ефекту

исхемије и реперфузије на синтезу овог цитокина. У *in vitro* студији излагање Bend.3 ћелија кисеонично глукозној депривацији довело је до пораста синтезе мРНК за IL1 $\beta$  више од 20 пута у односу на синтезу у контролним ћелијама 24 часа након реперфузије, што се поклапа са другим пиком инфламаторног одговора (Слика 7.). Овако снажна транскрипција довела је до пет пута веће синтезе овог цитокина код ћелија изложених исхемији реперфузији у односу на ћелије из контролне групе (Слика 9.). У *in vivo* студији 24 часа након оклузије средње моздане артерије код C5BL6 мишева добили смо девет пута већу синтезу овог цитокина у мозгу у односу на животиње које нису подвргнуте овој интервенцији (Слика 12).

Постоје подаци да ниво синтезе IL1 $\beta$  корелира са величином инфаркта и неуролошким оштећењем ткива мозга након исхемије. Међутим о неуротоксичности IL1 $\beta$  постоје разне контраверзе пошто је показано да убризгавањем IL1 $\beta$  у здрав мозак не узрокује никакво оштећење ткива. Такође додавањем овог цитокина примарној култури неурона не доводи до њихове смрти. Највеће дејство IL1 $\beta$  је показано на астроцитима. IL1 $\beta$  доводи до пролиферације и активације астроцита што води ка астроглијози ткива (92). Активација р38 митоген активирани протеин киназа сматра се одговорном за синтезу IL1 $\beta$  од стране астроцита и микроглије након исхемије мозга код пацова (93-95). Поред овог пута активације синтезе IL1 $\beta$ , активација Tool like receptor-4 (TLR4) се такође сматра важном за повећање синтезе IL1 $\beta$  након исхемије мозга (96). Интравентрикуларна апликација IL1 $\beta$  након оклузије средње моздане артерије код пацова повећава едем, величину инфаркта и акумулацију неутрофила (56). Иста група аутора показала је да мишеви дефицитарни за овај цитокин развијају мањи инфаркт након оклузије средње моздане артерије. Такође показали су да третман IL1 $\beta$  рецептор антагонистом (IL1 $\beta$ RA) смањује инфаркт мозга и неуролошко оштећење након исхемије (97,98) док мишеви дефицијентни за IL1 $\beta$ RA развијају значајно већи инфаркт од животиња без дефицијенције овог антагонисте (99).

Значај IL1 $\beta$  као потенцијалне мете за терапију мозданог удара испитивана је у више студија на животињама где се показало да администрација неутралишућег антитела за IL1 $\beta$  као и антагонисте рецептора овог цитокина (IL1ra) доводи значајног смањења оштећења мозга након исхемије (98,100-103). Повећана синтеза IL1 $\beta$  је повезана са апрегулацијом адхезионог молекула ICAM-1 и ендотелног леукоцитног адхезионог молекула који достижу пик синтезе 6-12 сати након исхемије. Оваква веза IL1 $\beta$  са адхезионим молекулима на ендотелним ћелијама омогућује утицај овог цитокина на трансмиграцију леукоцита из крви и њихову акумулацију у ткиву мозга након исхемије

(104). Обе форме IL1 цитокина се синтетизују као прекурсорни протеини. Прекурсор IL1 $\alpha$  је активан као такав док за активацију прекурсора IL1 $\beta$  потребно његово прекрајање помоћу ензима цистеин аспартат протеазе каспазе 1 или још познате као IL1 $\beta$  конвертујући ензим (105). Инхибиција овог ензима помоћу Ac-YVAD.cmk има неуропротективни ефекат након мишијег модела перманентног или транзијентног можданог удара (31,32). Важност овог ензима за развој инфламације након исхемије мозга потврђена је и у студији у којој су коришћени нокаут мишеви за овај ензим (106-109).

Узевши у обзир све наведене податке из досадашњих студија долазимо до закључка да IL1 фамилија цитокина а посебно IL1 $\beta$  имају важно место у пропагацији инфламаторног одговора након исхемичног можданог удара и да поред осталих цитокина представља важну мету будуће антиинфламаторне терапије. Имајући ово на уму тестирали смо антиинфламаторно дејство спиронолактона на синтезу IL1 $\beta$  након исхемије и реперфузије у *in vivo* и *in vitro* условима. Подаци добијени у *in vitro* експериментима показали су да третман спиронолактоном на почетку реперфузије доводи до пет пута мање синтезе иРНК за IL1 $\beta$  у односу на ћелије без третмана 24 часа након реперфузије у односу на ћелије које нису третиране овим леком (Слика 7.). Смањење транскрипционог потенцијала исхемије спиронолактоном довело је и до дупло мање синтезе самог цитокина након исхемије-реперфузије код Bend.3 ћелија (Слика 9.). У *in vivo* експериментима третман спиронолактоном је такође дупло смањио синтезу IL1 $\beta$  код мишева третираних овим леком на почетку реперфузије у односу на животиње без третмана (Слика 12.). На основу резултата добијених у овој студији можемо закључити да спиронолактон има антиинфламаторно дејство на синтезу IL1 $\beta$  као једног од најважнијих и најбитнијих инфламаторних медијатора након исхемичног можданог удара.

Експресија хемокина има значајну улогу у инфламацији након можданог удара повећавајући инфилтрацију леукоцита (110). У овој студији темељније смо обрадили хемокине MCP-1 (CCL2) и CXCL5 (ENA-78) због посебно значајне улоге у исхемично реперфузијом оштећењу. MCP-1 и CXCL5 су веома јаки хемоатрактанти моноцита и њихова експресија води ка масовној инфилтрацији моноцита након реперфузије. Показано је значајно повећање концентрације ових хемокина у цереброспиналној течности пацијената након исхемичног можданог удара (111,112). Више студија на *in vitro* моделима крвно мождане баријере, показало је да третман MCP-1 хемокином доводи до отварања крвномождане баријере и узрокује повећање њене пропустљивости

и до 17 пута у односу на контролну групу (113). Поред хемоатрактантне улоге MCP-1 хемокина на ћелије имуног система новије студије откривају још једну значајну улогу ових молекула. Посредством MCP-1 хемокина пут ка оштећеном ткиву налазе и стромалне ћелије костне сржи (114). На *in vivo* студијама код пацова је показано да долази до повећане експресије иРНК за MCP-1 од стране астроцита и микроглије након 6 сати од оклузије средње церебралне артерије и остаје повећана 12 до 48 сати (115,116). Четири дана након оклузије средње церебралне артерије експресија иРНК за MCP-1 се детектује у макрофазима у околини инфаркта ткива (117). Наши резултати добијени у овој студији такође иду у прилог повећаној експресији MCP-1 и CXCL5 након исхемије-реперфузије. У нашој *in vitro* студији излагање Bend.3 мишјих ендотелних ћелија мозга кисеонићно глукозној депривацији довело је до три пута веће синтезе иРНК за MCP-1 и више од шест пута веће синтезе CXCL5 у односу на контролне ћелије (Слика 7.). Повећана транскрипција иРНК за MCP-1 и CXCL5 у нашим *in vitro* експериментима узроковала је десет пута већу синтезу MCP-1 хемокина и пет пута већу синтезу CXCL5 код ендотелних ћелија мозга након исхемије реперфузије (Слика 9.). Повећана транскрипција иРНК за MCP-1 такође прати апрегулацију транскрипције иРНК за IL-1 и TNF- $\alpha$  што иде у прилог теорији да ови цитокини доводе до стимулације синтезе хемокина MCP-1 (50,117). *In vivo* експерименти на мишевима приказаним у овој студији такође иду у прилог стимулативном дејству исхемије реперфузије на синтезу хемокина. Уочено повећање експресије хемокина MCP-1 и CXCL5 у нашим експериментима 24 часа након транзијентне оклузије средње мождане артерије код мишева кретало се и до тринаест пута за MCP-1 и седам пута за CXCL5 у односу на контролне животиње (Слика 12.). Поједине студије су показале директну повезаност експресије ових хемокина и величине инфаркта. Интравентрикуларно убризган антагонист хемокинског рецептора (Вирусни макрофагни инфламаторни протеин 2) је довео до смањења величине инфаркта. Мишеви дефицијентни за MCP-1 или његов рецептор, CCR2, након транзијентне фокалне исхемије мозга имају мањи инфаркт, едем, инфилтрацију леукоцита и експресију инфламаторних медијатора (118-120). С'обзиром на значајност MCP-1 и CXCL5 у инфламаторном одговору ткива на исхемију-реперфузију испитали смо утицај спиронолактона на њихову експресију. У нашим резултатима запажена је значајно мања синтеза иРНК за ове хемокине након третмана ћелија спиронолактоном на почетку реперфузије у *in vitro* експериментата (Слика 7.). Овако смањена транскрипциона активност одразила се и на експресију самог протеина где смо имали

дупло мању синтезу MCP-1 и CXCL5 код ћелија третираних спиронолактоном на почетку реперфузије у односу на ћелије без третмана овим леком на почетку реперфузије (Слика 9.). Сличне резултате антиинфламаторног дејства спиронолактона на синтезу ових хемокина забележили смо и код *in vivo* експеримената где је третман овим леком такође преполовио синтезу ових хемокина у мозгу животиња након фокалне исхемије (Слика 12.). На основу ових резултата можемо закључити да спиронолактон има јако ихибиторно дејство на синтезу хемокина MCP-1 и CXCL5 као најбитнијих хемоатрактивних молекула након исхемичног можданог удара.

Инфилтрација леукоцита у ткиво мозга стимулисана је експресијом рецептора и адхезионих молекула индукованих ослобађањем инфламаторних медијатора из ткива захваћеног исхемијом. Ћелијски адхезиони молекули су подељени на основу структуре у три одвојене класе: селектини, интегрини и протеини имуноглобулин суперфамилије. У овој студији посебну пажњу смо обратили на протеине имуноглобулин суперфамилије због њихове значајне улоге у инфламаторном одговору ендотелних ћелија на инфламацију. Исхемија и реперфузија активирају ендотелне ћелије мозга стимулишући синтезу адхезионих молекула како би омогућили посредовану миграцију придонелих леукоцита на место инфламације. Активирани ендотелне ћелије мозга синтетишу неколико протеина чланова ове фамилије а најважнији су: ICAM-1, ICAM-2, PECAM-1 и VCAM-1(47,121-126).

Највеће интересовање влада за ICAM-1 као једног од најважнијег фактора медијације контакта између ендотелних ћелија и леукоцита и накнадне реоклузије крвних судова након реканализације исхемичног можданог удара. (124,127). Стимулација експресија ICAM-1 на ендотелним ћелијама мозга након исхемије индукована је инфламаторним медијаторима, цитокинима, као што су IL1- $\alpha$  и TNF- $\alpha$  (123). У *in vitro* студији на примарној култури ендотелних ћелија мозга изложених исхемији-реперфузији показана је повећана синтеза иРНК за ICAM-1. Групе аутора су показале да је повећање синтеза иРНК за ICAM-1 у *in vitro* студији имало свој највиши ниво 4-10 сати након реперфузије и могла се детектовати и до недељу дана након реперфузије ћелија (128-131). Резултати наших експеримената приказаних у овој студији су такође потврдили стимулативни ефекат исхемије-реперфузије на ендотелне ћелије мозга. Повећана експресија иРНК за ICAM-1 од четрнаест пута 24 часа након исхемије-реперфузије у *in vitro* експериментима приказаних у нашим резултатима недвосмислено показује јак утицај исхемије и реперфузије на синтезу овог адхезионог молекула (Слика 7., Слика 9., Слика10.). Студија на пацовима изложених транзијентној

оклузија церебралне артерије показала је повећање синтезе иРНК за ICAM-1 у делу мозга којег васкуларизује ова артеријска грана (132). Наши *in vivo* резултати такође иду у прилог повећаној синтези овог адхезионог молекула на ендотелним ћелијама мозга мишева 24 часа након експерименталног модела исхемичног možданог удара (Слика12., Слика13.).

Истраживања на пацијентима такође потврђују значајност ICAM-1 молекула на развој инфламаторног одговора након исхемичног možданог удара. Повећана количина солубилног ICAM-1 детектована је код пацијената након исхемичног možданог удара (124,133).

У неколико студија показани су значајни терапијски резултати инхибицијом овог адхезионог молекула након исхемије мозга. Трансгени мишеви мутанти за ICAM-1 ген имали су мање оштећење мозга након оклузије средње možдане артерије у поређењу са мишевима без ове мутације (134). Код транзијентне исхемије мозга употреба анти-ICAM-1 антитела значајно смањује оштећење ткива (135-137), акумулацију неутрофила (132,134) и апоптозу (138). У студијама на зечевима третман моноклоналним снтителом на ICAM-1 смањује неуролошки оштећење узроковано емболусом (135). Антиинфламаторни лек Ибупрофен показао је значајан утицај на синтезу овог адхезионог молекула. Третман овим леком значајно је смањено оштећење ткива мозга након исхемије. Терапијски успех Ибупрофена научници су довели у везу са инхибиторним дејством овог лека на синтезу ICAM-1 адхезионог молекула (139). На основу значајног места које овај адхезиони молекул заузима у пропагацији оштећења ткива након možданог удара од клиничке студије на пацијентима очекивао се велики искорак у терапији možданог удара. Дупло слепа, плацебо контролисана студија са анти-ICAM-1 антителом (Enlimomab, Boehringer, Ingelheim, Germany) била је веома разочаравајућа јер нису постигнути очекивани резултати. Третман анти-ICAM-1 антителом шест сати након исхемије имало је веома озбиљне нежељене ефекте и није довео до никакве разлике у опоравку пацијената 90 дана након možданог удара (140). Могући разлози за неуспех ове студије је коришћење нехуманизованог мишијег антитела код пацијената код којих није дошло до реканализације крвног суда. Сви пацијенти укључени у ову студију су имали перманентну оклузију крвног суда. Због значаја ICAM-1 у реперфузијом оштећењу ткива можда би терапија анти-ICAM-1 антителом дала боље резултате код пацијената након реканализације крвног суда у односу на оне са перманентном исхемијом мозга.

Као потенцијалну терапијску примену спиронолактона код možданог удара испитали

смо утицај овог лека на синтезу ICAM-1 након исхемично-реперфузионог оштећења. Резултати добијени у нашој *in vitro* студији показали су да спиронолактон доводи до дупло мање синтезе иРНК за ICAM-1 код ћелија третираних на почетку реперфузије у односу на контролне ћелије (Слика 7.). Овако смањење синтезе иРНК за ICAM-1 пројектовало се и на синтезу самог молекула где је забележено дупло мања синтеза 24 часа након реперфузије код ћелија третираних спиронолактоном у односу на ћелије без третмана (Слика 9., Слика 10.). Идентичне резултате смо добили и у *in vivo* експериментима на мишевима где је синтеза адхезионог молекула ICAM-1 након излагања животиња експерименталном моделу исхемичног можданог удара била дупло мања код животиња третираних овим леком на почетку реперфузије (Слика 12., Слика 13.). Спиронолактон је показао значајно ихибиторно дејство на синтезу ICAM-1 након *in vitro* и *in vivo* модела можданог удара што даје додатну могућност његове потенцијалне терапијске примене.

Исхемија и реперфузија такође доводе до стимулације синтезе азотних оксида као још једног важног медијатора инфламаторног одговора ткива мозга. Азотни оксид (NO) представља сигнални молекул укључен у важне физиолошке процесе као што су неуронска комуникација, имунолошка одбрана и регулисање васкуларног тонуса. Азотни оксид представља веома стабилан гас и лако дифундује кроз ћелијску мембрану доводећи до оштећења циљних молекула унутар ћелије (141). Продукција азотног оксида посредована је ензимом азотни оксид синтетаза (NOS). Постоје три главне форме NOS: неуронал NOS (nNOS или NOS 1), индуцибилни NOS (iNOS или NOS 2,) и ендотелни NOS (eNOS или NOS 3). Због своје значајности у исхемично реперфузионом оштећењу у нашој студији смо се фокусирали на iNOS и eNOS. iNOS је индуцибилан молекул и јавља се у процесима инфламације док је eNOS константно присутан и регулише тонус васкулатуре (142). У инфламацији као последици исхемично реперфузионог оштећења NO доводи до оштећења ДНК. (143) У случају исхемије повећана синтеза eNOS и његов вазодилатациони ефекат имају повољно дејство услед смањеног дотока крви у исхемично подручје мозга (144). За разлику од eNOS повећана синтеза iNOS у стању исхемије мозга доводи до додатног оштећења ткива стварањем пероксинитита.(143). Компетентне ћелије за синтезу iNOS су неутрофили, макрофази, микроглија и ендотелне ћелије мозга. Повећана експресија iNOS стимулирана исхемијом среће се како код животињских модела можданог удара (145,146) тако и код пацијената након исхемијног можданог удара (147). Експресија iNOS почиње већ у првим сатима након можданог удара и достиже највећи ниво



експресије 48 сати након почетка исхемије. Резултати наше студије такође иду у прилог повећаној експресији овог ензима. У нашим *in vitro* експериментима кисеонично глукозна депривација је узроковала дупло веће повећање транскрипције иРНК за iNOS и eNOS 24 часа након реперфузије (Слика 8.). Овако повећана синтеза иРНК за iNOS довела је до три пута веће синтезе овог ензима код Bend.3 мишјих ендотелних ћелија мозга 24 часа након реперфузије (Слика 10.). Резултати наших *in vivo* експеримената били су идентични онима добијеним у *in vitro* студији. Транзијентна исхемија средње моздане артерије код мишева довела је до више него дуплог повећања синтезе ензима iNOS и eNOS у мозгу ових животиња 24 часа након реперфузије у односу на животиње које нису излагане мозданој исхемији (Слика 13.). Више студија су показале да инхибиција синтезе iNOS доводи и до мањег инфаркта мозга и лакшег неуролошког оштећења након исхемичног мозданог удара (148,149). Студије на мишевима са "нокаутираним" геном за синтезу iNOS показале су знатно мањи инфаркт у односу на животиње без мутације (148). Све досадашње студије су показале да повећана синтеза iNOS води ка тежем оштећењу мозга након исхемије-реперфузије што га ставља у позицију добре мете за антиинфламаторну терапију исхемичног мозданог удара. На основу резултата из наведених студија испитали смо потенцијални повољан ефекат спиронолактона на ова два веома важна ензима у инфламаторном одговору ткива мозга на исхемију. Наши резултати у *in vitro* студији на Bend.3 ћелијама су показали да спиронолактон делује супресивно на синтезу ензима iNOS узрокујући дупло мању синтезу иРНК за овај ензим и три пута мању синтезу самог ензима код ћелија третираних овим леком након реперфузије од 24 часа у односу на контролне ћелије (Слика 8., Слика 10.). У студији на мишевима такође смо уочили значајно супресивно дејство спиронолактона на синтезу iNOS. Третман спиронолактоном смањивао је синтезу овог ензима за трећину синтезе регистроване код животиња без третмана на почетку реперфузије (Слика 13.). Још један повољан ефекат спиронолактона уочен је на синтезу eNOS. Наша *in vitro* студија је показала да је спиронолактон довео до значајног повећања синтезе иРНК а последично и до повећане продукције и самог ензима eNOS након исхемије-реперфузије (Слика 8., Слика 10.). Код експерименталних животиња, у *in vivo* експериментима, изложених транзијентној оклузији средње моздане артерије третман спиронолактоном довео је до значајног повећања синтезе овог ензима у мозгу животиња након реперфузије у односу на животиње без третмана (Слика 13). Због вазодилататорног дејства овог ензима на крвне судове мозга третман спиронолактоном представља повољан утицај на

перфузију мозга у првих 24 часа након реперфузије. Спиринолактон са израженим супресивним дејством на синтезу iNOS и стимулативним дејством на синтезу eNOS приказаним у овој студији представља веома добро потенцијално терапијско средство за исхемично реперфузионо оштећење ткива мозга након исхемичног možданог удара.

### 5.2.2. Утицај спинолактона на тежину неуролошког оштећења након експерименталног модела исхемичног možданог удара

У физиолошким условима микроваскулатура мозга као део крвномождане баријере представља врло рестриктивну структуру за пролаз компоненти имуног система из крви у ткиво одржавајући мозак имунопривилегованим органом. Крвно-мождана баријера ограничава пролазак моноцита, лимфоцита и других леукоцита из крви у ткиво мозга. У току исхемично реперфузионог оштећења мозга долази до синтезе различитих медијатора запаљења (цитокини, слободних радикала, еикосаноиди) који доводе до повећања пропустљивости крвно-мождане баријере (150,151). Инфламаторни медијатори у склопу исхемично реперфузионог оштећења доводе до функционалних и молекуларних промена крвномождане баријере узрокујући повећање њене пропустљивости (152,153). Велики број студија је показао значајно повећање пермеабилитета крвномождане баријере након излагања инфламаторним медијаторима као што су IL-1, TNF- $\alpha$ , хистамин (154,155). Миграција леукоцита у исхемијом захваћеном ткиву и даље је предмет истраживања али је за сада сигурно да адхезиони молекули, цитокини и хемокини имају важну улогу у овом процесу (152,156,157). Повећање пропустљивости крвномождане баријере представља иницијални механизам који води ка настајању едема, пролаза леукоцита у ткиво мозга, ослобађање инфламаторних медијатора што доводи до настајања *circulus vitiosus* и иреверзибилног оштећења ткива мозга. Јачина инфламаторног процеса директно се доводи у везу са тежином оштећења након исхемично реперфузионог оштећења мозга. Повећана пропустљивост крвномождане баријере након možданог удара често води ка тоталној дезинтеграцији крвно-мождане баријере и настанка хеморагичне трансформације исхемичног možданог удара (35,158). На животињским моделима показано је да се отварање крвномождане баријере након реперфузије одвија се у две фазе (159-161). Прва фаза отварања је транзијентна и настаје неколико сати од почетка реперфузије. Механизам отварања баријере у првој фази је хемодинамичке природе узрокован реперфузијом и карактерише га губитак ауторегулације и реактивна

хиперемиа. Студије на животињама као и клиничка испитивања су показала важну улогу акумулације слободних радикала и матрикс металопротеиназа (ММП) у овој фази отварања крвномождане баријере, нарушавајући интегритет базалне ламине и реметећи интегритет микроваскулатуре (65,162-166). Друга фаза отварања крвномождане баријере настаје 12 до 24 сати након реперфузије и поклапа се са максималним инфламаторним одговором ткива на исхемију-реперфузију (119,167-169). Морфолошки ова фаза отварања крвномождане баријере корелира са реорганизацијом актинског цитоскелета и редистрибуцијом протеина ћелијских спојница са плазма мембране у цитоплазму (170,171). Резултати наше студије су такође показали бифазно отварање крвномождане баријере мерењем трансендетелне резистенце након кисеонично-глукозне депривације у *in vitro* експериментима (Слика 11.). Отварање крвномождане баријере доводи до настанка едема, акумулације леукоцита и продубљивања клиничке слике након исхемичног можданог удара. На основу постојања великог броја доказа да инфламација ткива корелира са величином едема и оштећењем ткива мозга након исхемије-реперфузије испитали смо утицај већ показаног антиинфламаторног дејства спиронолактона на едем, величину инфаркта, неуролошко оштећење и преживљавање животиња након експерименталног модела исхемичног можданог удара. Резултати ове студије су показали знатно мањи едем и инфаркт мозга код животиња третираних спиронолактоном након модела исхемичног можданог удара мерено 24 часа од реперфузије у односу на групу животиња без третмана након реперфузије (Слика 14., Слика 15.). Смањени инфламаторни одговор ткива услед терапије спиронолактоном умањио је пропустљивост крвномождане баријере и на тај начин смањио едем, оштећење ткива и омогућио бољи опоравак и дуже преживљавање (Слика 16., Слика 17.). У *in vitro* студији смо такође уочили и показали знатно боље очуван интегритет међућелијских веза ендотелних ћелија третираних спиронолактоном након кисеонично-глукозне депривације, мерењем трансендетелне резистенце у односу на групу челија без третмана (Слика 11.). Животиње третиране овим леком након реперфузије имале су четири пута веће шансе да преживе 10 дана након исхемије-реперфузије од групе животиња без третмана. Антиинфламаторно дејство спиронолактона смањујући едем, величину инфаркта и неуролошко оштећење омогућило је знатно боље преживљавање и бржи опоравак животиња након модела исхемичног можданог удара што даје добру основу за даља истраживања терапијских могућности употребе спиронолактона након исхемичног можданог удара и код људи.

### 5.2.3. Молекуларни механизам антиинфламаторног дејства спиролактона на исхемично реперфузионо оштећење.

Инфламаторни гени се често транскриптују као кластери више различитих гена регулисаних истим транскрипционим фактором. NF- $\kappa$ B представља кључни транскрипциони фактор у инфламацији неопходан за транскрипцију различитих проинфламаторних медијатора (172,173). Велики број гена укључених у инфламацију поседује функционални  $\kappa$ B регион. Најзначајнији су гени за интерлеукин-1 (IL-1), туморнекротисфакторалфа (TNF- $\alpha$ ), интерлеукин-6 (IL-6), интерлеукин-10, (IL-10), моноцитни хемоатрактилни протеин-1 (MCP-1), ICAM-1, ICAM-2, циклооксигеназе-2 (COX2) и iNOS. Студије на *in vivo* моделима исхемичног мозданог удара показале су временски променљиво активирање и везивање транскрипционих фактора као и да активација овог транскрипционог фактора води ка апоптози активирањем апоптотичких механизма у ћелији (174). Хипоксија и реперфузија мозга сматра се веома снажним активатором овог транскрипционог фактора код ендотелних ћелија са последичном синтезом цитокина и хемокина (175,176). Транслокација NF- $\kappa$ B након исхемије реперфузије почиње још у првим минутима исхемије и може се детектовати и до 72 сата након реперфузије (177/179). Наши резултати приказани у овој студији иду у прилог овим тврдњама о раној и снажној активацији и транслокацији NF- $\kappa$ B под утицајем исхемије-реперфузије. Одређивањем активираниог NF- $\kappa$ B комплекса у *in vitro* експериментима показали смо његову снажну активацију и релокализацију у једру већ након два сата од реперфузије (Слика 18.). Читав процес праћен је повећаном фосфорилацијом I $\kappa$ B $\alpha$  инхибиторног протеина (Слика 19.). На моделима глобалне исхемије мозга група аутора је показала снажну активацију овог транскрипционог фактора у хипокампусу (174). Повећана синтеза адхезионог молекула ICAM-1 на ендотелним ћелијама мозга третираних цитокинима доведена је у директну везу са активацијом NF- $\kappa$ B (180). NF- $\kappa$ B као најзначајнији транскрипциони фактор у инфламацији био је мета инхибиције у различитим болестима узрокованим инфламацијом. Реуматоидни артритис као примарно инфламаторно обољење представљало је добар полигон за испитивање терапијске могућности инхибиције NF- $\kappa$ B. Инхибиција активности ИКК- $\beta$  значајно умањује последице адјувантног артритиса (181,182). Блокада NF- $\kappa$ B помоћу олигонуклеотида инхибира развој постстрептококног и колаген индукованог артритиса код пацова (183,184). Третман специфичним Т

ћелијским инхибитором NF-κB знаћајно смањује тежину колаген индукованог артритиса код мишева (185). Поред реуматоидног артритиса блокада NF-κB показала је потенцијално терапијско дејство и код Кронове болести. Локалним третманом p65 antisense олигонуклеотидом постигнута је комплетна резолуција Кронове болести без детектибилне клиничке и хистолошке активности (182). Због своје кључне улоге у инфламацији инхибиторна терапија NF-κB имала би велики потенцијал у примени након можданог удара.

Разни антиинфламаторни лекови који се данас користе у терапији модификују активност NF-κB. Неки од ефеката сулфасалазина, аспирина као и других нестероидних антиинфламаторних лекова као и кортикостероида коришћених у терапији Кронове болести, астме, псоријазе, реуматоидног артритиса су посредовани управо инхибицијом NF-κB. Сулфосалазин и лефлуномид блокирају транслокацију NF-κB посредством инхибиције деградације IκBα. Аспирин такође функционише као компетитивни инхибитор IKK-β. Међутим, сви ови лекови нису специфични блокатори NF-κB и захтевају примену великих доза да би постигле адекватну инхибицију овог транскрипционог фактора.

Блокатор минералокортикоидног рецептора, спиронолактон који се иначе не користи као антиинфламаторни лек у нашој студији је показао значајно антиинфламаторно дејство након експерименталног модела исхемичног можданог удара. Због свог широког и свеобухватног антиинфламаторног дејства испитали смо утицај спиронолактона на активацију p65 NF-κB након исхемичног можданог удара. Резултати наших *in vitro* истраживања показали су значајан инхибиторни утицај спиронолактона на активацију NF-κB након кисеонично глукозне депривације (Слика 18.). Ћелије третиране спиронолактоном након кисеонично глукозне депривације имале су знатно мању активацију и транслокацију NF-κB у једру. (Слика 20.) у односу на ћелије без третмана. У нашим резултатима показали смо да је спиронолактоном условљена инхибиција активације NF-κB посредована стабилизацијом комплекса IκBα-NFκB доводећи до мање фосфорилације IκBα и ослобађања активне форме NFκB (Слика 19.). На основу ових резултата можемо рећи да је један од молекуларних механизма антиинфламаторног дејства спиронолактона на Bend.3 ћелије након кисеонично глукозне депривације посредован инхибицијом NFκB што доводи до општег смањења синтезе инфламаторних медијатора. За разлику од других лекова спиронолактон је узроковао значајну инхибицију NFκB у веома ниској терапијској дози што олакшава његову евентуалну примену у терапији реперфузионог оштећења

након исхемичног možданог удара.

## 6. Закључак

Исхемични možдани удар представља један од водећих социоекономских проблема развијеног друштва. Због великог морталитета и инвалидитета који оставља за собом исхемични možдани удар окупира посебно интересовање научне јавности. И поред тога што велики број људи ради на унапређењу терапије исхемичног možданог удара није направљен већи искорак у овој области. Једини одобрени метод лечења је тромболитичка терапија као логично терапијско решење за реканализацију запушеног крвног суда. Тромболитичка терапија се доста мењала и усавршавала у последњих петнаест година али и даље постоје велика ограничења коришћења ове терапијске методе. Главни недостатци представљају кратак терапијски прозор од неколико сати и реперфузионо оштећење са хеморагичном трансформацијом што смањује фреквенцу успешности ове терапијске методе. Као основа свих компликација тромболитичке терапије налази се јак инфламаторни одговор ткива на реканализацију а посебно ендотелних ћелија мозга компромитујући интегритет крвномоздане баријере. Због свега наведеног данас се велики труд и средства улажу у проналажењу нових тромболитичких агенаса, ендоваскуларних механичких уређаја за локалну тромболизу као и рута за њихову администрацију, неуропротективних и антиинфламаторних агенаса како би се постигао што дужи терапијски прозор деловања, смањила могућност појаве компликација и побољшао физиолошки опоравак пацијената. Последњих година било је више различитих покушаја увођења антиинфламаторне и неуропротективне терапије у клиничкој пракси агенаса који су дали добре резултате у лабораторијским условима међутим из различитих разлога ни један од ових покушаја није дао адекватне резултате док су се неки од њих показали као веома штетни. У овој студији на *in vivo* мишјем моделу исхемичног možданог удара и *in vitro* моделу кисеонично-глукозне депривације мишјих ендотелних ћелија мозга показали смо веома јак и свеобухватан антиинфламаторни ефекат малих доза спиронолактона датих након реперфузије на инфламаторни фенотип ткива мозга и ендотелних ћелија мозга. Спинонолактон је у нашим експериментима довео до значајног смањења синтезе свих тестираних инфламаторних цитокина, хемокина, адхезионих молекула и слободних радикала након реперфузије. Испитивањем молекуларног механизма уоченог антиинфламаторног дејства овог лека уочили смо да третман спиронолактоном доводи

до инхибиције активације и релокализације NF-κB као једног од најважнијих транскрипционих фактора у инфламацији. Спиринолактон узрокује стабилизацију комплекса IκBα-NFκB доводећи до смањења фосфорилације IκBα и ослобађања активне форме NFκB чиме директо утиче на смањење синтезе инфламаторних медијатора. Третман спинолактоном на почетку реперфузије довео је до значајно мањег инфаркта мозга, лакшег неуролошког оштећења, мање смртности и бржег функционалног опоравка мишева након модела исхемичног мозданог удара.

Резултати добијени у овој студији представљају добру полазну тачку за даље испитивање антиинфламаторног дејства овог лека и његову потенцијалну примену као додатне терапијске мере након реканализације крвног суда након исхемичног мозданог удара. Употребу спинолактона олакшава чињеница да је то лек који је већ дуго низ година у клиничкој употреби и добро су испитана сва његова нежељена дејства. Доза спинолактона коришћена у овој студији представља минималну терапијску дозу коришћену у клиничкој пракси што додатно смањује могућност појаве нежељених дејства. Ова студија даје добру полазну основу и открива само површину до сада непознатог антиинфламаторног дејства спинолактона пружајући могућност за даље истраживање молекуларног механизма овог дејства. Показано антиинфламаторно дејство спинолактона на ендотелне ћелије мозга оставља могућност примене овог лека код свих обољења у чијој се основи налази инфламаторни процес на ендотелним ћелијама смањујући ризик за настанак цереброваскуларних болести. Код пацијената код којих постоји ризик за развој цереброваскуларних обољења збор свог антиинфламаторног дејства спинолактон би требало да има предност у терапији хипертензије у односу на остале антихипертензивне лекове. Ова студија баца једно ново светло на већ познати лек спинолактон и отвара могућности за његову примену поред досадашњих индикација на читав низ инфламаторних стања како у превенцији цереброваскуларних болести тако и у њиховом евентуалној терапији али истовремено оставља могућности за даља испитивања молекуларних механизма његовог антиинфламаторног дејства.

## *7. Референце*

1. Živković M, Šternić N, Kostić SV. Ishemična bolest mozga. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2000.

2. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča u kliničkoj praksi. Akutni moždani udar: Nacionalni vodič. Beograd: Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; 2004.
3. Virani, Nathan D. Wong, et al. Heart Disease and Stroke Statistics--2013 Update: A Report From the American Heart Association Subcommittee. *Circulation*. 2013; 127: e6-e245.
4. Jakovljević Đ, Mićović P. Zdravstveno stanje i zdravstvene potrebe stanovništva Srbije. Beograd: Palgo centar; 2004.
5. WHO. Deaths from stroke. Available from: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/cvd\\_atlas\\_16\\_death\\_from\\_stroke.pdf](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_16_death_from_stroke.pdf). Last visited: 15.05.2013.
6. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000; 190; 255-66.
7. Rodrigo R, Fernandez-Gajardo R, Gutierrez R, et al. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013; 12: 698-714.
8. Chan PH. Role of Oxidants in Ischemic Brain Damage Stroke. 1996; 27: 1124-9.
9. Charles CD, Simon GMD. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury; *Anesthesiology* 2001; 94: 1133-8.
10. Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain pathol* 2000; 10; 95-112.
11. Hsu CY. Criteria for valid preclinical trials using animal stroke models. *Stroke* 1993; 24: 633-6.
12. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 1986; 8: 1-8.
13. Nakagawa Y, Fujimoto N, Matsumoto K, Cervos-Navarro J. Morphological changes in acute cerebral ischemia after occlusion and reperfusion in the rat. *Adv Neurol* 1990; 52: 21-7.
14. Kastrup A, Engelhorn T, Beaulieu C, de Crespigny A, Moseley ME. Dynamics of cerebral injury, perfusion, and blood-brain barrier changes after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci* 1999; 166: 91-9.
15. Nicolazzo JA, Charman SA, Charman WN. Methods to assess drug permeability across the blood-brain barrier. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58: 281-93.
16. Brown RC, Morris AP, O'Neil RG. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain Res*



- 2007; 1130: 17–30.
17. Omidi Y, Campbell L, Barar J, Connell D, Akhtar S, Gumbleton M. Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b.End3, as an in vitro blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies. *Brain Res* 2003; 990: 95–112.
  18. Hayashi M, Tsutamoto T, Wada A, et al. Immediate administration of mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents post-infarct left ventricular remodeling associated with suppression of a marker of myocardial collagen synthesis in patients with first anterior acute myocardial infarction. *Circulation* 2003; 107: 2559-65.
  19. Fraccarollo D, Galuppo P, Schraut S, et al. Immediate mineralocorticoid receptor blockade improves myocardial infarct healing by modulation of the inflammatory response. *Hypertension* 2008; 51: 905-14.
  20. Han SY, Kim CH, Kim HS, et al. Spironolactone prevents diabetic nephropathy through an anti-inflammatory mechanism in type 2 diabetic rats. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1362-72.
  21. Bendtzen K, Hansen PR, Rieneck K, Spironolactone/Arthritis Study Group. Spironolactone inhibits production of proinflammatory cytokines, including tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma, and has potential in the treatment of arthritis. *Clin Exp Immunol* 2003; 134: 151-8.
  22. Takata H, Takeda Y, Zhu A, et al. Protective effects of mineralocorticoid receptor blockade against neuropathy in experimental diabetic rats. *Diabetes Obes Metab* 2012; 14: 155-62.
  23. Iraqi W, Rossignol P, Angioi M, et al. Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) study. *Circulation* 2009; 119: 2471-9.
  24. Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation* 2000; 102: 2700-6.
  25. Dorrance AM, Osborn HL, Grekin R, Webb RC. Spironolactone reduces cerebral infarct size and EGF-receptor mRNA in stroke-prone rats. *Am J Physiol Regul Integr*

- Comp Physiol 2001; 281: R944-50.
26. Iwanami J, Mogi M, Okamoto S, et al. Pretreatment with eplerenone reduces stroke volume in mouse middle cerebral artery occlusion model. *Eur J Pharmacol* 2007; 566: 153-9.
  27. Pan J, Konstas AA, Bateman B, Ortolano GA, Pile-Spellman J. Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology* 2007; 49: 93-102.
  28. N Fujimura, K Noma, T Hata, et al. (for the ROCK Study Group). Mineralocorticoid receptor blocker eplerenone improves endothelial function and inhibits Rho-associated kinase activity in patients with hypertension. *Clin Pharmacol Therap* 2012; 91: 289–97.
  29. [Syngle A](#), [Vohra K](#), [Khichi D](#), [Garg N](#), [Verma I](#), [Kaur L](#). Spironolactone improves endothelial dysfunction in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* 2013; in press.
  30. Hallenbeck JM, Dutka AJ. Background review and current concepts of reperfusion injury. *Arch Neurol* 1990; 47: 1245–125.
  31. Zoppo GJ, Becker KJ, Hallenbeck JM. Inflammation after stroke: is it harmful? *Arch Neurol* 2001; 58: 669–72.
  32. Latour LL, Kang DW, Ezzeddine MA, Chalela JA, Warach S. Early blood–brain barrier disruption in human focal brain ischemia. *Ann Neurol* 2004; 56: 468–77.
  33. Hamann GF, Okada Y, del Zoppo GJ. Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 1373–8.
  34. Aronowski J, Strong R, Grotta JC. Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow* 1997; 17: 1048–56.
  35. Yang GY, Betz AL. Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1994; 25: 1658–65.
  36. Dietrich WD. Morphological manifestations of reperfusion injury in brain. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 723: 15–24.
  37. Kuroda S, Siesjo BK. Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. *Clin Neurosci* 1997; 4: 199–212.
  38. Hallenbeck J, Dutka AJ, Tanishima T et al. Polymorpho-nuclear leukocyte accumulation in brain regions with low bloodflow during the early post ischemic period. *Stroke* 1986; 17: 246–53.
  39. Zoppo GJ, Mabuchi T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 879–94.

40. Zoppo GJ, Schmid-Schonbein GW, Mori E et al. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 1991; 22: 1276–83.
41. Nishigaya K, Yoshida Y, Sasuga M, Nukui H, Ooneda G. Effect of recirculation on exacerbation of ischemic vascular lesions in rat brain. *Stroke* 1991; 22: 635–42.
42. Jean WC, Spellman SR, Nussbaum ES, Low WC. Reperfusion injury after focal cerebral ischemia: the role of inflammation and the therapeutic horizon. *Neurosurgery* 1998; 43: 1382–96.
43. D'Ambrosio AL, Pinsky DJ, Connolly ES. The role of the complement cascade in ischemia/reperfusion injury: implications for neuroprotection. *Mol Med* 2001; 7: 367-82.
44. Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM et al. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. *Shock for neuroprotection. Mol Med* 2004; 21: 401-9.
45. Warach S, Latour LL. Evidence of reperfusion injury, exacerbated by thrombolytic therapy, in human focal brain ischemia using a novel imaging marker of early blood-brain barrier disruption. *Stroke* 2004; 35(11 Suppl 1): 2659–2.
46. Louis R. Caplan Stroke Thrombolysis : Slow Progress. *Circulation* 2006; 114: 187-90.
47. Liu T, Clark RK, McDonnell PC, et al. Tumor necrosis factor expression in ischemic neurons. *Stroke* 1994; 25: 1481-8.
48. Buttini M, Appel K, Sauter A, Gebicke-Haerter PJ, Boddeke HW. Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischaemia in the rat. *Neuroscience* 1996; 71: 1-16.
49. Wang X, Yue TL, Barone FC, White RF, Gagnon RC, Feuerstein GZ. Concomitant cortical expression of TNF- and IL-1 mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol* 1994; 23: 103-14.
50. Liu T, Mc Donnell PC, Young PR, et al. Interleukin-1 mRNA expression in ischemic rat cortex. *Stroke* 1993; 24: 1746-51.
51. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 1990; 75: 40-7.
52. Murakami Y, Saito K, Hara A, et al. Increases in tumor necrosis factor-alpha following transient global cerebral ischemia do not contribute to neuron death in mouse hippocampus. *J Neurochem* 2005; 93: 1616-22.
53. Offner H, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Vandenbark AA, Hurn PD. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 654-65.
54. Tomimoto H, Akiyuchi I, Wakita H, Kinoshita A, Ikemoto A, Nakamura S, et al.

- Glial expression of cytokines in the brains of cerebrovascular disease patients. *Acta Neuropathol* 1996; 92: 281-7.
55. Sairanen T, Carpen O, Karjalainen-Lindsberg ML, Paetau A, Turpeinen U, Kaste M, et al. Evolution of cerebral tumor necrosis factor-alpha production during human ischemic stroke *Stroke*. 2001; 32: 1750-8.
  56. Vila N, Castillo J, Davalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* 2000; 31: 2325-9.
  57. Exel E, Gussekloo J, Craen AJ, Bootsma-van der Wiel A, Frolich M, Westendorp RG. Inflammation and stroke: the Leiden 85-Plus Study. *Stroke* 2002; 33: 1135-8.
  58. Castellanos M, Castillo J, Garcia MM, et al. Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions: a potential therapeutic target. *Stroke* 2002; 33: 982-7.
  59. Dziewulska D, Mossakowski MJ. Cellular expression of tumor necrosis factor a and its receptors in human ischemic stroke. *Clin Neuropathol* 2003; 22: 35-40.
  60. Offner H, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Vandenbark AA, Hurn PD. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 654-65.
  61. Lambertsen KL, Clausen BH, Fenger C, et al. Microglia and macrophages express tumor necrosis factor receptor p75 following middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience* 2007; 144: 934-49.
  62. Haddad M, Rhinn H, Bloquel C, et al. Anti-inflammatory effects of PJ34, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, in transient focal cerebral ischemia in mice. *Br J Pharmacol* 2006; 149: 23-3.
  63. Stolphen AH, Guinan EC, Fiers W, Pober JS. Recombinant tumor necrosis factor and immune interferon act singly and in combination to reorganize human vascular endothelial cell monolayers. *Am J Pathol* 1986; 123: 16-24.
  64. Dobbie MS, Hurst RD, Klein NJ, Surtees RA. Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 expression on human endothelial cells by tumour necrosis factor-alpha in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Brain Res*. 1999; 830: 330-6.
  65. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation-291. *Glia* 2002; 39: 279.
  66. Franzén B, Duvefelt K, Jonsson C, et al. Gene and protein expression profiling of human cerebral endothelial cells activated with tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Mol Brain Res* 2003; 115: 130-46.
  67. Yang GY, Gong C, Qin Z, et al. Inhibition of TNFalpha attenuates infarct volume and ICAM-1 expression in ischemic mouse brain. *Neuroreport* 1998; 9: 2131-4.
  68. Dawson DA, Martin D, Hallenbeck JM. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces focal cerebral ischemic injury in the spontaneously hypertensive rat. *Neurosci Lett* 1996; 218: 41-4.

69. Lavine SD, Hofman FM, Zlokovic BV. Circulating antibody against tumor necrosis factor-alpha protects rat brain from reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 52-8.
70. Wang CX, Shuaib A. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. *Prog Neurobiol* 2002; 67: 161-72.
71. Barone FC, Arvin B, White RF, et al. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 1997; 28: 1233-44.
72. Nawashiro H, Tasaki K, Ruetzler CA, Hallenbeck JM. TNF-alpha pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17: 483-90.
73. Ali C, Nicole O, Docagne F, et al. Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 956-66.
74. Berti R, Williams AJ, Moffett JR, et al. Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia-reperfusion brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 1068-79.
75. Block F, Peters M, Nolden-Koch M. Expression of IL-6 in the ischemic penumbra. *Neuroreport* 2000; 11: 963-7.
76. Suzuki S, Tanaka K, Nogawa S, et al. Temporal profile and cellular localization of interleukin-6 protein after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 1256-62.
77. Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, et al. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and longterm outcome. *BMC Neurol* 2004, 4: 2.
78. Waje-Andreassen U, Krakenes J, Ulvestad E, et al. IL-6: an early marker for outcome in acute ischemic stroke. *Acta Neurol Scand* 2005; 111: 360-5.
79. Orion D, Schwammenthal Y, Reshef T, et al. Interleukin-6 and soluble intercellular adhesion molecule-1 in acute brain ischaemia. *Eur J Neurol* 2008; 15: 323-8.
80. Emsley HC, Smith CJ, Georgiou RF, et al. A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 1366-72.
81. Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;

- 18: 176–9.
82. Yamashita T, Sawamoto K, Suzuki S, et al. Blockade of interleukin-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice: possible involvement of Stat3 activation in the protection of neurons. *J Neurochem* 2005; 94: 459–68.
  83. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 2007; 184: 53–68.
  84. Dripps DJ, Brandhuber BJ, Thompson RC, Eisenberg SP. Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist binds to the 80-kDa IL-1 receptor but does not initiate IL-1 signal transduction. *J Biol Chem* 1991; 266: 10331-6.
  85. Rothwell NJ. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12: 430-6.
  86. Koga S, Ogawa S, Kuwabara K, Brett J, Leavy JA, Ryan J, et al. Synthesis and release of interleukin 1 by reoxygenated human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1992; 90: 1007-15.
  87. Minami M, Kuraishi Y, Satoh M. Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 beta, IL-6, TNF alpha and LIF in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176: 593-8.
  88. Buttini M, Boddeke H. Peripheral lipopolysaccharide stimulation induces interleukin-1 beta messenger RNA in rat brain microglial cells. *Neuroscience* 1995; 65: 523-30.
  89. Buttini M, Sauter A, Boddeke HW. Induction of interleukin-1 beta mRNA after focal cerebral ischaemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 23: 126-34.
  90. Davies CA, Loddick SA, Toulmond S, Stroemer RP, Hunt J, Rothwell NJ. The progression and topographic distribution of interleukin-1beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 87-98.
  91. Haqqani AS, Nestic M, Preston E, Baumann E, Kelly J, Stanimirovic D. Characterization of vascular protein expression patterns in cerebral ischemia/reperfusion using laser capture microdissection and ICAT-nanoLC-MS/MS. *FASEB J* 2005; 19: 1809-21.
  92. John GR, Chen L, Rivieccio MA, Melendez-Vasquez CV, Hartley A, Brosnan CF. Interleukin-1beta induces a reactive astroglial phenotype *via* deactivation of the Rho GTPase-Rock axis. *J Neurosci* 2004; 24: 2837-45.
  93. Irving EA, Barone FC, Reith AD, Hadingham SJ, Parsons AA. Differential activation of MAPK/ERK and p38/SAPK in neurones and glia following focal cerebral

- ischaemia in the rat. *Brain Res* 2000; 77: 65–75.
94. Walton KM, DiRocco R, Bartlett BA, et al. Activation of p38MAPK in microglia after ischemia. *J Neurochem* 1998; 70: 1764–7.
  95. Barone FC, Irving EA, Ray AM, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase provides neuroprotection in cerebral focal ischemia. *Med Res Rev* 2001; 21: 129–45.
  96. Simi A, Lerouet D, Pinteaux E, Brough D. Mechanisms of regulation for interleukin-1b in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology* 2007; 52: 1563–9.
  97. Yang GY, Zhao YJ, Davidson BL, Betz AL. Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in the mouse brain reduces ischemic brain injury. *Brain Res* 1997; 751: 181–8.
  98. Relton JK, Martin D, Thompson RC, Russell DA. Peripheral administration of interleukin-1 receptor antagonist inhibits brain damage after focal cerebral ischemia in the rat. *Exp Neurol* 1996; 138: 206–13.
  99. Pinteaux E, Rothwell NJ, Boutin H. Neuroprotective actions of endogenous interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) are mediated by glia. *Glia* 2006; 53: 551–6.
  100. Relton JK, Rothwell NJ. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. *Brain Res Bull* 1992; 29: 242–6.
  101. Garcia JH, Liu KF, Relton JK. Interleukin-1 receptor antagonist decreases the number of necrotic neurons in rats with middle cerebral artery occlusion. *Am J Pathol* 1995; 147: 1477–86.
  102. Mulcahy N, Ross J, Rothwell NJ, Loddick SA. Delayed administration of interleukin-1 receptor antagonist protects against transient cerebral ischemia in the rat. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 471–6.
  103. Yamasaki Y, Matsuura N, Shizuhara H, Onodera H, Itoyama YKK. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in the rats. *Stroke* 1995; 26: 676–81.
  104. Wang XK, Feuerstein GZ. Induced expression of adhesion molecules following focal brain ischemia. *J Neurotrauma* 1995; 12: 825–32.
  105. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992; 356: 768–74.
  106. Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, et al. Inhibition of interleukin 1b converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2007–12.

107. Rabuffetti M, Sciorati C, Tarozzo G, Clementi E, Manfredi AA, Beltramo M. Inhibition of caspase-1-like activity by Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethyl ketone induces long-lasting neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease of proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 2000; 20: 4398–404.
108. Friedlander RM, Yuan J. ICE, neuronal apoptosis and neurodegeneration. *Cell Death Diff* 1998; 5: 823–31.
109. Schielke GP, Yang GY, Shivers BD, Lorrin Betz A. Reduced ischemic brain injury in interleukin-1b converting enzyme-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 180–5.
110. Emsley HC, Tyrrell PJ. Inflammation and infection in clinical stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 1399-419.
111. Losy J, Zaremba J. Monocyte chemoattractant protein-1 is increased in the cerebrospinal fluid of patients with ischemic stroke. *Stroke* 2001; 32: 2695-6.
112. Zaremba J, Skrobański P, Losy J. The level of chemokine CXCL5 in the cerebrospinal fluid is increased during the first 24 hours of ischaemic stroke and correlates with the size of early brain damage. *Folia Morphol (Warsz)*. 2006 ; 65: 1-5.
113. Stamatovic SM, Shaku P, Keep RF, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 593-606.
114. Wang L, Li Y, Chen J, et al. Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Exp Hematol* 2002; 30: 831-6.
115. Yabuuchi K, Minami M, Katsumata S, Yamazaki A, Satoh M. An in situ hybridization study on interleukin-1 beta mRNA induced by transient forebrain ischemia in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 26: 135-42.
116. Wang X, Yue T-L, Barone FC, Feuerstein GZ. Monocyte chemoattractant protein-1 messenger RNA expression in rat ischemic cortex. *Stroke* 1995; 26: 661-6.
117. Gourmala NG, Buttini M, Limonta S, Sauter A, Boddeke HW. Differential and time-dependent expression of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA by astrocytes and macrophages in rat brain: effects of ischemia and peripheral lipopolysaccharide administration. *Neuroimmunology* 1997; 74: 35 - 44.
118. Hughes PM, Allegrini PR, Rudin M, Perry VH, Mir AK, Wiessner C. Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 308–17.
119. Dimitrijevic OB, Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV. Absence of the



- chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia / reperfusion injury in mice. *Stroke* 2007; 38: 1345–53.
120. Andjelkovic AV, Spencer DD, Pachter JS. Visualization of chemokine binding sites on human brain microvessels. *J Cell Biol* 1999; 145: 403-12.
  121. Zoppo GJ. Microvascular responses to cerebral ischemia/inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 823: 132 - 47.
  122. Diacovo TG, deFougerolles AR, Bainton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest* 1994; 94: 1243 - 51.
  123. Frijns CMJ, Kappelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 2002; 33: 2115 - 22.
  124. Kaplanski G, Farnarier C, Kaplanski S, et al. Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood* 1994; 84: 4242-8.
  125. Lindsberg PJ, Carpen O, Paetau A, Karjalainen-Lindsberg ML, Kaste M. Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke. *Circulation* 1996; 94: 939-45.
  126. Xu H, Tong IL, De Fougerolles AR, Springer TA. Isolation, characterization, and expression of mouse ICAM-2 complementary and genomic DNA. *J Immunol* 1992; 149: 2650 - 5.
  127. Mori E, del Zoppo GJ, Chambers JD, Copeland BR, Arfors KE. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons. *Stroke* 1992, 23: 712–8.
  128. Hess DC, Bhutwala T, Sheppard JC, Zhao W, Smith J. ICAM-1 expression on human brain microvascular endothelial cells. *Neurosci Lett* 1994; 168: 201-14.
  129. Hess DC, Zhao W, Carroll J, McEachin M, Buchanan K. Increased expression of ICAM-1 during reoxygenation in brain endothelial cells. *Stroke* 1994; 25: 1463-7.
  130. Klempt ND, Sirimanne E, Gunn AJ, et al. Hypoxia-ischemia induces transforming growth factor beta 1 mRNA in the infant rat brain. *Res Mol Brain Res* 1992; 13: 93-101.
  131. Zhang RL, Chopp M, Zhang ZG, et al. E-selectin in focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 1126 - 36.
  132. Zhang RL, Chopp M, Zaloga C, et al. The temporal profiles of ICAM-1 protein and mRNA expression after transient MCA occlusion in the rat. *Brain Res* 1995; 682: 182-8.

133. Shyu KG, Chang H, Lin CC. Serum levels of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with acute ischaemic stroke. *J Neurol* 1997; 244: 90-3.
134. Connolly ESJ, Winfree CJ, Springer TA, et al. Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest* 1996; 97: 209 - 16.
135. Bowes MP, Zivin JA, Rothlein R. Monoclonal antibody to the ICAM-1 adhesion site reduces neurological damage in a rabbit cerebral embolism stroke model. *Exp Neurol* 1993; 119: 215-9.
136. Zhang RL, Chopp M, Jiang N, et al. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. *Stroke* 1995; 26: 1438 - 42.
137. Zhang RL, Chopp M, Li Y, et al. Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurology* 1994; 44: 1747 - 51.
138. Chopp M, Li Y, Jiang N, Zhang RL, Probstak J. Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 578-84.
139. Antezana DF, Clatterbuck RE, Alkayed NJ, et al. High-dose ibuprofen for reduction of striatal infarcts during middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosurg* 2003; 98: 860-6.
140. Polmar SH, Sherman DS. Double-blind, randomized, placebo- controlled, parallel-group trial of the efficacy and safety of enlimomab (anti-ICAM-1) compared to placebo administered within 6 hours of the onset of symptoms for the treatment of acute ischemic stroke. 22nd International Joint Conference on Stroke and Cerebral Circulation (Abstract XJO); 1996.
141. Llorens S, Jordán J, Nava E. The nitric oxide pathway in the cardiovascular system. *J Physiol Biochem* 2002; 58: 179-88.
142. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997; 100: 2417-23.
143. Cui J, Holmes EH, Greene TG, Liu PK. Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. *Faseb J* 2000; 14: 955-67.
144. Huang Z, Huang PL, Ma J, et al. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 981-7.

145. Nakashima MN, Yamashita K, Kataoka Y, Yamashita YS, Niwa M.  
Time course of nitric oxide synthase activity in neuronal, glial, and endothelial cells of rat striatum following focal cerebral ischemia. *Cell Mol Neurobiol* 1995; 15: 341–9.
146. Iadecola C, Zhang F, Casey R, Clark HB, Ross ME. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 1996; 27: 1373–80.
147. Forster C, Clark HB, Ross ME, Iadecola C. Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts. *Acta Neuropathol* 1999; 97: 215–20.
148. Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross ME. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci* 1997; 17: 9157–64.
149. Parmentier S, Bohme GA, Lerouet D, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents ischaemic brain injury. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 546–52.
150. Glabinski AR. Chemokines in central nervous system pathology. *Neurol Neurochir Pol* 1999; 33: 897–906.
151. Miller DW. Immunobiology of the blood-brain barrier. *J Neurovirol* 1999; 5: 570–8.
152. Stanimirovic D, Satoh K. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. *Brain Pathol* 2000; 10: 113–26.
153. Petty MA, Lo EH. Junctional complexes of the blood–brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog Neurobiol* 2002; 68: 311–23.
154. Guo YL, Kang B, Williamson JR. Resistance to TNF- $\alpha$  cytotoxicity can be achieved through different signaling pathways in rat mesangial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1999; 276: C435–44.
155. Hurst RD, Clark JB. Alterations in transendothelial electrical resistance by vasoactive agonists and cyclic AMP in a blood-brain barrier model system. *Neurochem Res* 1998; 23: 149–54.
156. Merrill JE, Murphy SP. Inflammatory events at the blood brain barrier: regulation of adhesion molecules, cytokines, and chemokines by reactive nitrogen and oxygen species. *Brain Behav Immun* 1997; 11: 245–63.
157. Dietrich JB. The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood–brain barrier. *J Neuroimmunol* 2002; 128: 58–68.
158. Watson BD, Prado R, Veloso A, et al. Cerebral blood flow restoration and reperfusion injury after ultraviolet laser-facilitated middle cerebral artery recanalization in rat thrombotic stroke. *Stroke* 2002; 33: 428–34.

159. Kuroiwa T, Ting P, Martinez H, Klatzo I. The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol* 1985; 68: 122–9.
160. Pluta R, Lossinsky AS, Wisniewski HM, Mossakowski MJ. Early blood-brain barrier changes in the rat following transient complete cerebral ischemia induced by cardiac arrest. *Brain Res* 1994; 633: 41–52.
161. Belayev L, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 1996; 739: 88–96.
162. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 1998; 29: 2189–95.
163. Heo JH, Lucero J, Abumiya T, et al. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 624–33.
164. Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke* 2000; 31: 3034–40.
165. Sumii T, Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 2002; 33: 831–6.
166. Pfefferkorn T, Rosenberg GA. Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rtPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke* 2003; 34: 2025–30.
167. Wojciak-Stothard B, Entwistle A, Garg R, Ridley AJ. Regulation of TNF- $\alpha$ -induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell–cell junction by Rho, Rac and Cdc42 in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1998; 176: 150–65.
168. Dietrich JB. The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood–brain barrier. *J Neuroimmunol* 2002; 128: 58–68.
169. Matsumoto T, Ikeda K, Mukaida N, et al. Prevention of cerebral edema and infarct in cerebral reperfusion injury by an antibody to interleukin-8. *Lab Invest* 1997; 77: 119–125.
170. Bolton SJ, Anthony DC, Perry VH. Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced

- blood–brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience* 1998; 86: 1245–57.
171. Couraud PO. Infiltration of inflammatory cells through brain endothelium. *Pathol Biol (Paris)* 1998; 46: 176–80.
  172. Baldwin AS Jr, The NF-kB and IκB proteins: New discoveries and insights. *Ann Rev Immunol* 1996; 14: 649-81.
  173. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kB and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995; 9: 899-909.
  174. Schneider A, Martin-Villalba A, Weih F, Vogel J, Wirth T, Swaninger M. NF-kB is activated and promotes death in focal cerebral ischemia. *Nature Medicine* 1999; 5: 554-9.
  175. Howard EF, Chen Q, Cheng C, Carroll JE, Hess D. NF-kB is activated and ICAM-1 gene expression is upregulated during reoxygenation of human brain endothelial cells. *Neurosci Lett* 1998; 248: 199-203.
  176. Schmedtje JF Jr., Ji YS, Liu WL, DuBois R, Runge MS. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 601-8.
  177. Li C, Ha T, Liu L, Browder W, Kao RL. Adenosine prevents activation of transcription factor NF-kB and enhances activator protein-1 binding activity in ischemic rat heart. *Surgery* 2000; 127: 161–9.
  178. Clemens JA, Stephenson DT, Dixon EP, et al. Global cerebral ischemia activates nuclear factor kappaB prior to evidence of DNA fragmentation. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 48: 187–96.
  179. Clemens JA, Stephenson DT, Yin T, Smalstig EB, Panetta JA, Little SP. Drug-induced neuroprotection from global ischemia is associated with prevention of persistent but not transient activation of nuclear factor-kappaB. *Stroke* 1998; 29: 677–82.
  180. Lockyer JM, Colladay JS, Alperin-Lea W, Hammond T, Buda AJ. Inhibition of nuclear factor -kB-mediated adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Circ Res* 1998; 82: 314-21.
  181. Tsao PW, et al. The effect of dexamethasone on the expression of activated NF-kappa B in adjuvant arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 83: 173-8.
  182. Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschenfelde KH, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of

- NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* 1996; 2: 998-1004.
183. Miagkov AV, Kovalenko DV, Brown CE et al. NF-kappaB activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13859-64.
184. Tomita T, Takeuchi E, Tomita N, et al. Suppressed severity of collagen-induced arthritis by in vivo transfection of nuclear factor kappa B decoy oligodeoxynucleotides as a gene therapy. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 2532-42.
185. Gerlag DM, Ransone L, Tak PP, et al. Effect of a T cell specific NF-kB inhibitor on in vitro cytokine production and collagen-induced arthritis. *J Immunol* 2000; 165: 1652-8.



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**  
8.1. Кључна документацијска информатика

**Редни број (РБ):**

**Идентификациони број (ИБР):**

**Тип документације (ТД):**

Монографска публикација

**Тип записа (ТЗ):**

Текстуални штампани материјал

**Врста рада (ВР):**

Докторска дисертација

**Аутор (АУ):**

Др Никола Сладојевић

**Ментор (МН):**

Проф. Др Анушка Анђелковић Zochowska

**Наслов рада (НР):**

Утицај малих доза спиронолактона на инфламаторни одговор проузрокован реперфузијом можданог ткива у експерименталном мишјем моделу исхемичког можданог удара

**Језик публикације (ЈП):**

Српски (ћирилица)

**Језик извода (ЈИ):**

Српски (ћирилица)/Енглески

**Земља публикавања (ЗП):**

Република Србија

**Уже географско подручје (УГП):**

Централна Србија



**Година (ГО):**

2013.

**Издавач (ИЗ):**

Ауторски репринт

**Место и адреса (МС):**

34 000 Крагујевац, СРБ, Светозара Марковића 69

**Физичи опис рада (ФО):**

7 поглавља, 87 стране, 185 цитата, 20 слика, 2 табеле

**Научна област (НО):**

Медицина

**Научна дисциплина (ДИ):**

Неурологија, Патологија

**Предметна одредница/ кључне речи (ПО):**

мождани удар, спиронолактон, инфламација, реперфузионо оштећење, NFκB

**УДК:**

**Чува се (ЧУ):**

Универзитет у Крагујевцу

Библиотека Факултета медицинских наука Крагујевац

34 000 Крагујевац, СРБ, Светозара Марковића 69

**Важна напомена (МН):**

**Извод (ИД):**

Исхемични мождани удар представља други узрок смртности и први узрок трајног инвалидитета у развијеним земљама. Висока цена лечења и рехабилитације ових пацијената сврстава мождани удар у један од највећих социоекономских проблема данашњег друштва. Главни недостаци примене тромболитичке терапије, као једине одобрене терапије можданог удара, су кратак прозор деловања, реперфузионо оштећење и хеморагија. У основи свих компликација тромболитичке терапије налази се јак инфламаторни одговор ткива настао наглом реканализацијом крвног суда. Употреба малих доза спиронолактона након реперфузије код

експерименталног мишјег модела исхемичног možданог удара показала је значајно смањење експресије инфламаторних медијатора (citoкина, хемокина, слободних радикала и адхезионих молекула) ендотелних ћелија и целог ткива мозга као резултат стабилизације NF-κB-IκBα комплекса и онемогућавање релокализације транскрипционог фактора NF-κB у једру што има за последицу смањење инфламације, инфаркта и едема мозга, блажих неуролошких оштећења, бржи опоравак и смањење смртности. Резултати ове студије откривају до сада непознату улогу спиринолактона у модулисању инфламаторног одговора ендотелних ћелија мозга, као и молекуларни механизам овог дејства на исхемично реперфузионо оштећење након експерименталног мишјег модела možданог удара отварајући могућност коришћења овог добро познатог лека у терапији možданог удара и других инфламаторних стања ендотела која фаворизују настанак možданог удара.

**Датум прихватања теме од стране ННВ (ДП):**

27.03.2013.

**Датум одбране (ДО):**

**Чланови комисије (КО):**

Проф. др Драган Миловановић, председник

Проф. др Гордана Тончев, члан

Проф. др Александар Рашковић

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC**

**FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC**

8.2 Key words documentation

**Accession number (ANO):**

**Identification number (INO):**

**Documentation type (DT):**

Monographic publication

**Type of record (TR):**

Textual material, printed

**Contents code (CC):**

PhD. Thesis

**Author (AU):**

Nikola Sladojevic, M.D.

**Menthor(MN):**

Anuska Andjelkovic Zochowska, M.D.,Ph.D.

**Title (TI):**

Low-dose Spironolactone therapy markedly reduced brain post-ischemic inflammatory response in mouse model of stroke.

**Language of text (LT):**

Serbian (Cyrilic)

**Language of abstract (LA):**

Serbian (Cyrilic)/English

**Country of publication (CP):**

Republic of Serbia

**Locality of publication (LP):**

Central Serbia

**Publication year (PY):**

2013.

**Publisher (PU):**

Author reprint

**Publication place (PP):**

34 000 Kragujevac, SRB, Svetozara Markovica 69

**Physical description (PD):**

7 chapters, 87 pages, 185 citations, 20 pictures, 2 tables

**Scientific field (SF):**

Medicine

**Scientific discipline (SD):**

Neurology, Pathology

**Subject/key words (SKW):**

stroke, spironolactone, reperfusion injury, inflammation, NFκB

**UDC:****Holding data:**

University of Kragujevac

Library of Faculty of Medical Science Kragujevac

34 000 Kragujevac, SRB, Svetozara Markovica 69

**Note (N):****Abstract (AB):**

Stroke is one of the most frequent causes of death and disability worldwide, and has significant clinical and socioeconomic impact. Recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) is currently the only drug approved for treatment of acute stroke. However, thrombolytic therapy with rtPA can be associated with a number of complications. Many of the rtPA related complications result from its thrombolytic action including bleeding (intracerebral and systemic haemorrhage), reperfusion injury with oedema, and angioedema. Beside all this complications is profound tissue inflammatory response

following recanalization of occluded vessel. In our study, the administration of a low dose Spironolactone showed strong anti-inflammatory effects at the brain endothelial cells and whole brain tissue, blocking cytokine, chemokine, reactive oxygen species and adhesion molecule expression, after experimental model of stroke in in vivo and in vitro experiments. Animals treated with low dose Spironolactone during the onset of reperfusion exhibit less brain edema, smaller infarct volume and mortality rate, better neurological scores and better stroke recovery. This effect of Spironolactone was achieved by diminishing the activity of NF $\kappa$ B transcription factor in brain endothelial cells, a master regulator of pro-inflammatory cytokine/chemokine/adhesion molecule expression during the ischemia-reperfusion injury. Anti-inflammatory effect of low dose-Spironolactone treatment on ischemia-reperfusion injury after stroke based on its effects in this study represents for the first time a potential of Mineralocorticoid receptor antagonist Spironolactone in prevention and stroke therapy.

**Accepted by the Scientific Board on (ASB):**

27.03.2013.

**Defended on (DE):**

**Thesis defended board (DB)**

**(Degree/name/surname/title/faculty):**

Dragan Milovanovic, M.D.,Ph.D., president

Gordana Toncev, M.D.,Ph.D., member

Aleksandar Raskovic, M.D.,Ph.D., member from Medical Faculty Novi Sad

## 8.6 ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I. Аутор</i></b>
Име и презиме: Никола Сладојевић
Датум и место рођења: 04.10.1980. Ниш
Садашње запослење: Одсек за неуропатологију Медицинског факултета Универзитета у Мичигену у Ен Арбору (Ann Arbor), САД
<b><i>II. Докторска дисертација</i></b>
Наслов: Утицај малих доза спиронолактона на инфламаторни одговор проузрокован реперфузијом можданог ткива у експерименталном мишјем моделу исхемичког можданог удара
Број страница: 87
Број слика: 22
Број библиографских података: 185
Установа и место где је рад израђен: Одсек за неуропатологију Медицинског факултета Универзитета у Мичигену у Ен Арбору (Ann Arbor), САД
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: Проф. др Анушка Анђелковић Zochowska
<b><i>III. Оцена и одбрана</i></b>
Датум пријаве теме: 29.10.2012.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: Проф. др Драган Миловановић, председник Проф. др Гордана Тончев, члан Проф. др Александар Рашковић
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: Проф. др Драган Миловановић, председник Проф. др Гордана Тончев, члан Проф. др Александар Рашковић
Комисија за оцену докторске дисертације: Проф. др Драган Миловановић, председник Проф. др Гордана Тончев, члан Проф. др Александар Рашковић
Комисија за одбрану докторске дисертације: Проф. др Драган Миловановић, председник Проф. др Гордана Тончев, члан Проф. др Александар Рашковић
Датум одбране дисертације: