

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Nataša Lončarević-Vasiljković

**UTICAJ RESTRIKTIVNOG REŽIMA ISHRANE NA
PLASTIČNOST NEURONA I GLIJE NAKON
POVREDE SENZOMOTORNE KORE MOZGA
PACOVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Nataša Lončarević-Vasiljković

**EFFECT OF DIETARY RESTRICTION ON
NEURONAL AND GLIAL PLASTICITY
FOLLOWING INJURY TO THE RAT
SOMATOSENSORY CORTEX**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE:

Mentori:

Dr Selma Kanazir, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

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

Članovi komisije:

Dr Vesna Pešić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Dr Sabera Ruždijić, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Dr Milka Perović, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju, Odeljenja za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta “Plastičnost mozga tokom starenja: uticaj dijetalne restrikcije i anestezije (#173056, rukovodilac dr Selma Kanazir), koji finansira Ministarstvo za prosvetu i nauku Republike Srbije.

Zabvaljujem se svojim mentorima dr Selmi Kanazir i dr Saberi Ruždijić koje su me strpljivo i pažljivo usmeravale u radu i profesionalnom razvoju. Bez njihovih korisnih sugestija sa jedne strane, i potpune slobode u radu sa druge strane, rad na ovoj tezi ne bi bio tako ispunjavajuće iskustvo. Zabvaljujem se na pruženoj podršci i poverenju, kao i na omogućenim odličnim uslovima za eksperimentalni rad.

Dr Nadeždi Nedeljković se zabvaljujem na poverenju, kao i na korisnim savetima koji su uobličili ovu tezu.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Vesni Pešić koja me je strpljivo vodila kroz doktorat nesebično deleći samnom svoje znanje, iskustvo i dragoceno vreme. Hvala na velikoj posvećenosti i neprocenjivoj pomoći u izradi ove disertacije, kao i na mnogobrojnim plodnim diskusijama.

Zabvaljujem se kolegama iz Laboratorije za molekularnu neurobiologiju Desi, Milki, Aleksandri, Vesni, Divni i Marjani na podršci i drugarskoj atmosferi, a izuzetnu zahvalnost dugujem Kosari, Kiki, Tijani i Smilji za divna prijateljstva koja su obeležila ovaj period.

Kolegama iz “laboratorije 25“ hvala na divnom druženju i podršci.

“Mirinim devojkama“ veliko hvala na svim onim sitnim, a tako važnim savetima koji su bili od neprocenjive vrednosti tokom izrade ove teze, ali prvenstveno na uspostavljanju divnih prijateljstava koja su obeležila ovaj period. Posebno sam zahvalna Danisto na nesebičnoj pomoći u poslednjim trenucima izrade teze.

Janko, Miloše i Branka, hvala vam na neizmernoj ljubavi i strpljenju Mom bati Milošu dugujem posebnu zahvalnost za nespavane noći koje je proveo sređujući ovaj rukopis kako bi on izgledao kako sada izgleda.

REZIME:

Uticaj restriktivnog režima ishrane na plastičnost neurona i glije nakon povrede senzomotorne kore mozga pacova

Traumatska povreda mozga (*engl.* traumatic brain injury, TBI) predstavlja povredu moždanog tkiva uzrokovanu mehaničkom povredom glave. TBI je jedan od vodećih uzroka smrtnosti i invaliditeta u svetu, u populaciji ljudi do 45 godina starosti. Posledice TBI zavise od lokalizacije i količine oštećenja moždanog tkiva i mogu varirati od blažih motoričkih i kognitivnih smetnji, pa sve do težih oblika invaliditeta i smrti. Traumatska povreda mozga dovodi do narušavanja krvno-moždane barijere, što rezultuje tačno određenim sledom događaja u povređenom tkivu CNS-a. Naime, akutna faza, označena kao primarna povreda, nastaje direktnim delovanjem mehaničke sile na moždano tkivo i javlja se u trenutku povrede. Događaji koji slede nakon toga označeni su kao sekundarna povreda koja nastaje kao posledica inicijalnog oštećenja, a obuhvata procese koji dovode do daljeg oštećenja tkiva u danima i nedeljama nakon povrede. To su pre svega zapaljenski procesi koji dovode do smrti neurona koji prvobitno nisu bili zahvaćeni mehaničkom povredom. Smatra se da je broj neurona koji umre usled širenja sekundarne povrede daleko veći od broja neurona koji strada usled primarne povrede.

Činjenica da se većina procesa u okviru sekundarne povrede odigrava relativno kasno (satima i danima nakon povrede) čini ih podložnim različitim terapijskim intervencijama. Već decenijama je poznato da restrikcija hrane povoljno deluje na čitav organizam tako što odlaže starosno-zavisne fiziološke promene i smanjuje incidencu različitih obolenja (kancer, autoimunske bolesti, Parkinsonova i Alchajmerova bolest, itd.) Međutim, tek u poslednjih desetak godina intenzivno se istražuje uticaj smanjenog unosa hrane na procese oporavka nakon povrede. Dosadašnja istraživanja na ovom polju su pokazala da restrikcija hrane u trajanju od nekoliko meseci pre povrede CNS-a ima neuroprotektivno dejstvo i promoviše funkcionalni oporavak u nekoliko različitih modela povrede.

Efekti dijetalne restrikcije na različite aspekte sekundarne povrede, kao i na sekundarnu ćelijsku smrt nakon traumatske povrede mozga još uvek nisu dovoljno ispitani. Stoga je cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi da li i u kojoj meri dijetalna restrikcija (DR) može uticati na procese koji se u mozgu dešavaju nakon povrede, a pre svega, da li može

da utiče na procese sekundarne povrede. Za potrebe eksperimenta, mužjaci pacova *Wistar* soja stari 3 meseca su podeljeni u dve grupe, *ad libitum* životinje (AL) i životinje na restriktivnom režimu ishrane (DR). Životinje iz AL grupe imale su neograničen pristup hrani tokom čitavog vremena trajanja eksperimenta, dok su životinje iz DR grupe dobijale 50% normalnog dnevnog unosa hrane. Sa navršenom starošću od 6 meseci životinje su podvrgnute ubodnoj leziji senzomotorne kore prednjeg mozga, a zatim su žrtvovane u različitim vremenskim tačkama: kontrola, 2, 7, 14. i 28. dan nakon lezije. Kako bi se utvrdio efekat dijetalne restrikcije na oporavak nakon traumatske povrede mozga praćeni su procesi inflamacije, sekundarne neurodegeneracije i neuralne plastičnosti. Primenom metoda Western blot analize, RT- i PCR-a u realnom vremenu, histološkog bojenja i imunohistohemije ispitivane su promene u vremenskoj i prostornoj ekspresiji ciljnih iRNK i proteina, markera ovih procesa.

Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije pokazuju da dijetalna restrikcija u značajnoj meri menja odgovor tkiva mozga na povredu, utičući na brojne procese nakon povrede. Naime, dobijeni rezultati su pokazali da dijetalna restrikcija utiče na procese inflamacije suprimirajući aktivaciju mikroglijskih ćelija, kao i indukciju solubilnog TNF- α proteina nakon povrede. Takođe, DR deluje neuroprotektivno suprimirajući indukciju aktivne kaspaze-3 i sekundarnu smrt neurona u ranoj fazi oporavka nakon povrede mozga. Dijetalna restrikcija povećava ekspresiju proteina sinaptičke plastičnosti GAP-43 i sinaptofizina oko samog mesta povrede, uz istovremenu supresiju aktivacije astrocita i smanjenje sinteze inhibitornog proteoglikana neurokana. Takođe, DR dovodi do izrazitog povećanja koncentracije kortikosterona, kao i posledične promene u fosforilaciji GR-a, i u nivou 11 β -HSD1 proteina nakon povrede. Dijetalna restrikcija je uticala i na ekspresiju transkripcionog faktora NF- κ B, kao i na ekspresiju iRNK za Bcl-2 i Bcl-xL, antiapoptotskih gena koje reguliše NF- κ B.

Rezultati ove studije su pokazali da dijetalna restrikcija ima kapacitet da u značajnoj meri oblikuje odgovor povređenog tkiva mozga direktnim uticajem na procese sekundarne povrede, ali i plastičnosti. Takođe, ovi rezultati ukazuju na mogućnost primene dijetalne restrikcije i u kliničkoj praksi kod povreda mozga.

Ključne reči: povreda mozga, moždana kora, dijetalna restrikcija, pacov

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Molekularna neurobiologija

UDK BROJ: [616-001.1 : 611.813] : 613.24 (043.3)

ABSTRACT:

Effect of dietary restriction on neuronal and glial plasticity following injury to the rat somatosensory cortex

Traumatic brain injury (TBI) represents a brain tissue injury caused by mechanical head injury. TBI is one of the leading causes of death and disability in the world human population, up to 45 years of age. Consequences of brain injury depend on the location and amount of brain tissue damage, and can range from mild motor and cognitive impairment, to severe forms of disability and death. Traumatic brain injury leads to impairment of blood-brain barrier, resulting in a precisely defined sequence of events in injured CNS tissue. Two main phases could be distinguished: acute phase, which is called the primary injury that occurs by direct action of mechanical forces on the brain tissue and occurs at the time of injury. The events that followed thereafter are called the secondary injury. Secondary injury occurs as a result of the initial damage, and includes the processes that lead to further tissue damage in the days and weeks following injury. These are primarily inflammatory processes that lead to the death of neurons that initially were not affected by mechanical injury. It is believed that the neuronal cell death caused by secondary injury is far greater than the one caused by primary injury.

The fact that most of the processes within the secondary injury occur relatively late (hours and days following injury) makes them subject to various therapeutic interventions. For decades, it is known that food restriction has a beneficial effect on the entire organism by delaying age-dependent physiological changes and reducing the incidence of various diseases (cancer, autoimmune disease, Parkinson's and Alzheimer's, etc). However, only in the last ten years has been to investigate the influence reduced food intake in the recovery process following injury. Previous research in this field has shown that several months long food restriction prior to CNS injury has neuroprotective effects and promotes functional recovery in several different models of injury.

The data considering effects of DR on different aspects of secondary injury, as well as secondary neuronal cell death following TBI are still scarce. Therefore, the aim of this study was to determine whether dietary restriction (DR) can affect the processes that occur in the brain after injury, primarily, whether it can influence the process of secondary injury. For the purpose of the experiment, male *Wistar* rats 3 months old were divided into two

groups, the *ad libitum* animals (AL) and the dietary restricted animals (DR). Animals from the AL group had unlimited access to food throughout the duration of the experiment, whereas the animals DR groups received 50% of normal daily food intake. Upon reaching the age of 6 months, the animals were subjected to stab lesion to the somatosensory cortex, and then were sacrificed at different time points: control, 2, 7, 14 and 28 day following lesion. In order to determine the effect of dietary restriction on processes following TBI following processes were examined: inflammatory processes, secondary neurodegeneration and neural plasticity. Changes in the temporal and spatial expression of target mRNA and proteins were examined by using Western blot analysis, RT-PCR and real-time RT-PCR, histological and immunohistochemical staining.

To determine the effect of dietary restriction on recovery following TBI genes and proteins involved in the processes of inflammation, secondary neurodegeneration, as well as those who participate in the processes of plasticity, were investigated.

The results obtained in this thesis show that dietary restriction significantly changes the brain tissue response to injury, affecting numerous processes following injury. Namely, dietary restriction affects the inflammatory process by suppression of microglial activation, and TNF- α protein induction following injury. Also, DR acts neuroprotective by suppressing active caspase-3 induction and secondary neuronal death in the early phase of recovery following brain injury. Dietary restriction increases the expression of synaptic plasticity proteins GAP-43 and synaptophysin around the site of the injury, with simultaneous suppression of the activation of astrocytes and reduction of synthesis of inhibitory proteoglycan - neurocan. Also, DR leads to a prominent increase in the concentration of corticosterone, and consequent changes in the GR signaling pathway. Dietary restriction affected the expression of NF-kappaB transcription factor, as well as the expression of mRNA for Bcl-2 and Bcl-xL, antiapoptotic genes regulated by mentioned transcription factor.

The results of this study showed that dietary restriction has the capacity to significantly shape the response of damaged brain tissue by direct impact on the processes of secondary injury and neural plasticity. Also, these results point to the possibility of using dietary restriction in clinical practice for patients who have suffered a brain injury.

Key words: brain injury, cerebral cortex, dietary restriction, rat

RESEARCH AREA: Biology

RESEARCH FIELD: Molecular neurobiology

UDC NUMBER: [616-001.1 : 611.813] : 613.24 (043.3)

SKRAĆENICE:

11 β -HSD1 - 11beta hidrosisteroid dehidrogenaza 1

AL - *ad libitum*

Apaf-1 (*engl.* apoptosis protease activating factor-1) – aktivirajući faktor-1 proteaze apoptoze

Bcl-2 – (*engl.* B-cell lymphoma 2) – B-ćelijski limfom 2, regulatorni protein apoptoze

Bcl-xL – (*engl.* B-cell lymphoma-extra large) - B-ćelijski limfom-ekstra veliki, protein koji promovira preživljavanje

BDNF - (*engl.* brain derived neurotrophic factor) - trofički protein poreklom iz mozga

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

CNS - centralni nervni sistem

CSPG - (*engl.* chondroitin sulfate proteoglycans) - hondroitin sulfatni proteoglikani

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

DR - dijetalna restrikcija

GAP-43 - (*engl.* growth-associated protein 43) – protein asociran sa rastom 43

GC - (*engl.* glucocorticoids) – glukokortikoidi

GFAP - (*engl.* glial fibrillary acidic protein) – glijalni fibrilarni kiseli protein

GR - (*engl.* glucocorticoid receptor) - glukokortikoidni receptor

Hsp70 - (*engl.* heat shock protein 70) - protein toplotnog stresa 70

Iba-1 – (*engl.* ionized calcium binding adaptor molecule 1) – jonizujući kalcijum vezujući adaptorski molekul 1

IF - (*engl.* intermittent fasting) - intermitentna dijeta

KORT - kortikosteron

MR - (*engl.* Mineralocorticoid receptor) – mineralokortikoidni receptor

NF- κ B - (*engl.* nuclear factor - κ B) – jedarni faktor - κ B

PCR - (*engl.* Polymerase Chain Reaction)- lančana reakcija polimerizacije

pGR - (engl. phosphorylated glucocorticoid receptor) – fosforilisani glukokortikoidni receptor

PNS - periferni nervni sistem

RNK - ribonukleinska kiselina

SPH - (engl. synaptophysin) – sinaptofizin

TACE - (engl. TNF- α -converting enzyme) - TNF- α -konvertujući enzim

TBI - (engl. traumatic brain injury) – traumatska povreda mozga

TNFR - TNF- α receptor

TNF- α - (engl. tumor necrosis factor alpha) – faktor nekroze tumora alfa

Sadržaj

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. Uvod | 1 |
| 1.1. Traumatska povreda mozga..... | 2 |
| 1.2. Sled događaja nakon TBI | 2 |
| 1.2.1. Hemostaza (prvi sati nakon povrede)..... | 3 |
| 1.2.2. Inflamacija (sati → dani)..... | 3 |
| 1.2.2.1. Odgovor mikrogljijskih ćelija na traumatsku povredu mozga | 4 |
| 1.2.2.2. Uloga TNF- α u procesima inflamacije nakon TBI..... | 5 |
| 1.2.2.3. Sekundarna ćelijska smrt nakon TBI..... | 6 |
| 1.2.3. Oporavak (dani → nedelje) | 7 |
| 1.2.3.1. Uloga astrocita u procesima oporavka nakon povrede..... | 7 |
| 1.2.3.2. Procesni oporavka CNS-a nakon povrede..... | 12 |
| 1.2.4. Remodelovanje (nedelje → meseci)..... | 14 |
| 1.3. Dijetalna restrikcija..... | 15 |
| 1.3.1. Efekti dijetalne restrikcije..... | 15 |
| 1.3.2. Mehanizmi delovanja dijetalne restrikcije..... | 16 |
| 1.3.3. Efekti dijetalne restrikcije na procese oporavka nakon TBI..... | 18 |
| 2. Ciljevi rada | 20 |
| 3. Materijal i metode | 22 |
| 3.1. Eksperimentalne životinje | 23 |
| 3.2. Restrikcija hrane | 23 |
| 3.3. Povreda kore prednjeg mozga | 23 |
| 3.4. Eksperimentalna procedura | 24 |
| 3.4.1. Izolacija tkiva | 24 |
| 3.5. Biohemijske analize..... | 24 |
| 3.5.1. Određivanje koncentracije kortikosterona u serumu | 24 |
| 3.5.2. Određivanje koncentracije glukoze u serumu | 25 |
| 3.6. Određivanje težine nadbubrežne žlezde | 25 |
| 3.7. Izolacija RNK i reverzna transkripcija (RT) | 25 |
| 3.7.1. Analiza i kvantifikacija PCR produkata | 26 |
| 3.7.2. Kvantitativni RT-PCR u realnom vremenu (Q-PCR) | 27 |
| 3.8. Određivanje količine proteina semikvantitativnom analizom imunoblotova..... | 28 |
| 3.8.1. Izolovanje proteina | 28 |
| 3.8.2. Određivanje koncentracije proteina..... | 28 |
| 3.8.3. Elektroforeza proteina | 29 |
| 3.8.4. Prenos proteina sa SDS-poliakriamidnog gela na nitroceluloznu membranu i imunološka detekcija imobilizovanih proteina (Western blotting) | 29 |
| 3.8.5. Semikvantitativna analiza imunoblotova | 30 |
| 3.9. Histološke analize..... | 31 |
| 3.9.1. Priprema tkiva za histološku analizu..... | 31 |
| 3.9.2. Imunohistohemijsko obeležavanje | 31 |
| 3.9.2.1. Kvantifikacija Iba-1-pozitivnih ćelija..... | 32 |
| 3.9.3. Histološka bojenja | 33 |
| 3.9.3.1. Fluoro-Žad B i Hoëchst 33528 bojenje | 33 |
| 3.10. Statistička obrada podataka | 34 |
| 4. Rezultati | 35 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1 Uticaj dijetalne restrikcije na telesnu težinu, težinu nadbubrežne žlezde, nivo glukoze i kortikosterona u serumu životinja..... | 36 |
| 4.1.1. Uticaj dijetalne restrikcije na telesnu težinu životinja..... | 36 |
| 4.1.2. Uticaj dijetalne restrikcije na težinu nadbubrežne žlezde pacova | 36 |
| 4.1.4. Uticaj dijetalne restrikcije na nivo kortikosterona u serumu životinja..... | 38 |
| 4.2 Uticaj dijetalne restrikcije na procese inflamacije u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede..... | 39 |
| 4.2.1. Uticaj dijetalne restrikcije na aktivaciju mikroglije | 39 |
| 4.3.2. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju solubilnog TNF- α proteina (17 kDa) | 43 |
| 4.4. Uticaj dijetalne restrikcije na sekundarnu smrt nervnih ćelija u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede | 44 |
| 4.4.1. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju aktivne kaspaze-3 (17kDa)..... | 44 |
| 4.4.2. Uticaj dijetalne restrikcije na preživljavanje neurona nakon povrede..... | 45 |
| 4.5. Uticaj dijetalne restrikcije na aktivaciju astrocita u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede..... | 48 |
| 4.5.1. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju GFAP proteina | 48 |
| 4.5.2. Uticaj dijetalne restrikcije na morfološke karakteristike astrocita | 49 |
| 4.5.3. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju inhibitornog proteoglikana neurokana..... | 50 |
| 4.6 Uticaj dijetalne restrikcije na procese plastičnosti nakon povrede..... | 54 |
| 4.6.1. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju iRNK za GAP-43 u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede | 54 |
| 4.6.2. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju GAP-43 proteina u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede | 55 |
| 4.6.3. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju iRNK za sinaptofizin u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede | 58 |
| 4.6.4. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju proteina sinaptofizina u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede | 58 |
| 4.7. Uticaj dijetalne restrikcije na nivo ukupnog i fosforilisanog GR-a u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede | 61 |
| 4.8. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju p65 subjedini NF κ B proteina u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede | 63 |
| 4.9. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju iRNK za Bcl-2 i Bcl-xL u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede | 64 |
| 4.10. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju 11 β -HSD1 proteina u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede | 66 |
| 5. Diskusija | 67 |
| 5.1. Efekat dijetalne restrikcije na procese inflamacije i neurodegeneracije nakon povrede mozga..... | 70 |
| 5.2. Efekat dijetalne restrikcije na procese plastičnosti nakon povrede mozga | 73 |
| 5.3. Efekat dijetalne restrikcije na astroglijske ćelije nakon povrede mozga..... | 75 |
| 5.4. Efekat dijetalne restrikcije na koncentraciju kortikosterona u serumu i uticaj ovog hormona na procese sekundarne povrede..... | 78 |
| 6. Zaključci | 90 |
| 7. Literatura | 93 |

1. Uvod

1.1. Traumatska povreda mozga

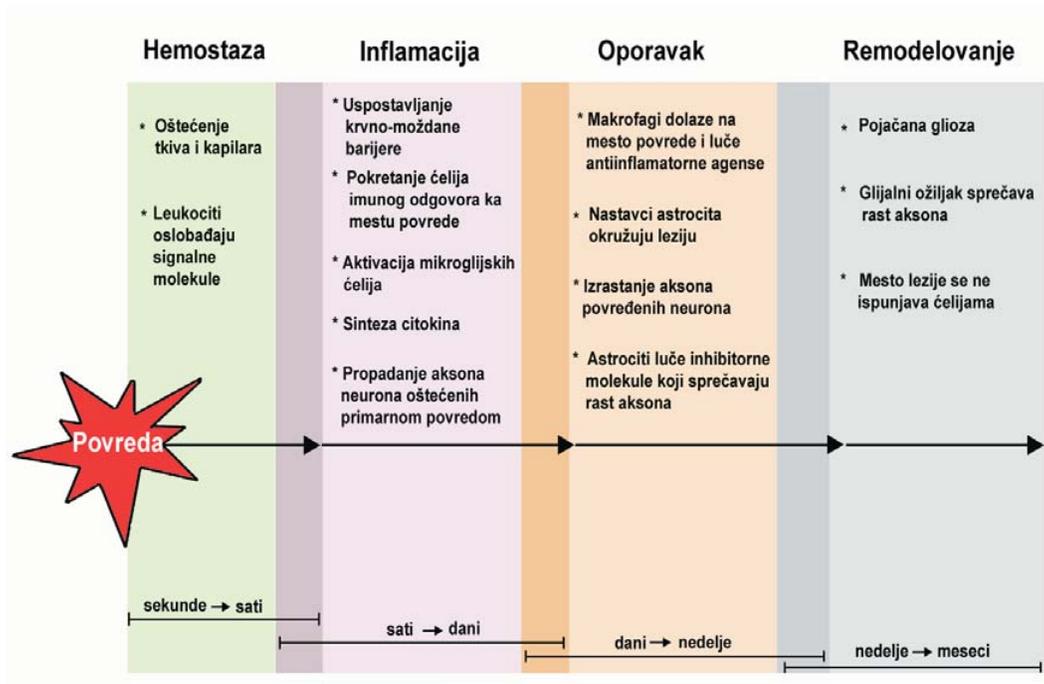
Traumatska povreda mozga (*engl.* traumatic brain injury, TBI) predstavlja povredu moždanog tkiva uzrokovanu mehaničkom povredom glave. TBI je jedan od vodećih uzroka smrtnosti i invaliditeta u svetu, u populaciji ljudi do 45 godina starosti (Peković i saradnici, 2006). Posledice TBI zavise od lokalizacije i stepena oštećenja moždanog tkiva i mogu varirati od blažih motoričkih i kognitivnih smetnji, pa sve do težih oblika invaliditeta i smrti. Kod TBI možemo razlikovati akutnu fazu, odnosno **primarnu povredu** koja nastaje direktnim delovanjem mehaničke sile na moždano tkivo i javlja se u trenutku povrede. Događaji koji slede nakon toga predstavljaju **sekundarnu povredu** koja nastaje kao posledica inicijalnog oštećenja, a obuhvata procese koji dovode do daljeg oštećenja tkiva u danima i nedeljama nakon povrede. To su pre svega zapaljenski procesi koji dovode do degeneracije neurona koji prvobitno nisu bili zahvaćeni mehaničkom povredom (Stroncek i Reichert, 2008).

1.2. Sled događaja nakon TBI

Traumatska povreda mozga dovodi do narušavanja krvno-moždane barijere, što je praćeno tačno određenim fazama u povređenom tkivu CNS-a. Ovi događaji mogu se podeliti u četiri osnovne faze (Slika 1):

- 1) **hemostaza**
- 2) **inflamacija**
- 3) **oporavak i**
- 4) **remodelovanje**

Sam proces zarastanja povređenog tkiva počinje od trenutka narušavanja krvno-moždane barijere, odnosno od onog trenutka kada povreda nastane (Clark i saradnici, 1994). Važno je spomenuti da jasne granice između pomenutih faza ne postoje, već se one smenjuju u tkivu vodeći ga u sledeću fazu oporavka. Uspešnost oporavka zavisi od čitavog niza faktora. Upravo zbog toga različita tkiva imaju različitu sposobnost regeneracije i reparacije. Ono što treba imati u vidu jeste da CNS adulta ima izuzetno ograničen regenerativni kapacitet. Upravo se zbog toga kod ljudi koji su preživeli povredu CNS-a često javljaju funkcionalne poteškoće.



Slika 1: Shema vremenskog sleda događaja nakon povrede CNS-a. (Preuzeto i modifikovano iz: Stroncek i Reichert, 2008)

1.2.1. Hemostaza (prvi sati nakon povrede)

Povreda narušava krvno-moždanu barijeru usled čega serum i ćelije krvi dospevaju na mesto povrede (Clark i saradnici, 1994). Krvarenje stvara ugrušak koji predstavlja privremenu barijeru koja sprečava dodatno krvarenje i ograničava širenje patogena unetih pri nastanku povrede u krvotok (Stroncek i Reichert, 2008). Aktivacija trombocita u okviru ugruška dovodi do oslobađanja brojnih signalnih molekula. Ćelije koje učestvuju u imunom odgovoru i reparaciji bivaju hemotaktički privučene do "skladišta" ovih molekula koji su nagomilani unutar ugruška što dovodi do inflamacije, sledeće faze u procesu oporavka.

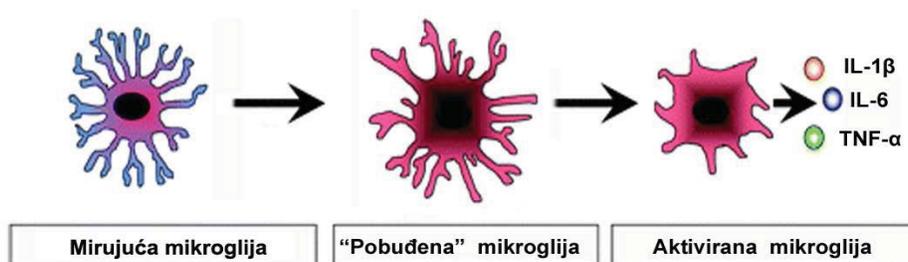
1.2.2. Inflamacija (sati → dani)

Sredinu u kojoj inflamacija počinje čine povređeno tkivo, komponente ugruška (trombociti, eritrociti i fibrin), proteini seruma, ali i strane materije koje su unešene u tkivo u trenutku povrede (Fine i Mustoe, 2006). Inflamacija je pokrenuta oslobađanjem signalnih molekula na mestu povrede tokom hemostaze (Martin, 1997). Hemoatraktanti koje oslobađaju trombociti pojačavaju vazodilataciju i permeabilnost krvnih sudova, dovodeći do povećanog regrutovanja leukocita. Početni proces inflamacije je uobičajen za sve tipove

tkiva, jer bilo koja fizička trauma dovodi do formiranja trombocitnog čepa i pokretanja imunskih ćelija ka mestu povrede. Međutim, u moždanom tkivu ova faza nakon povrede je praćena još jednim procesom, a to je aktivacija mikroglije. Pretpostavlja se da mikroglijske ćelije igraju glavnu ulogu u početnom inflamatornom odgovoru, s obzirom na to da krvno-moždana barijera u velikoj meri onemogućava makrofagima da dospeju do mesta povrede u toku ove rane faze (George i Griffin, 1994). Međutim, makrofagi i limfociti iz drugih tkiva mogu dospeti u tkivo mozga u kasnijim fazama inflamacije i dodatno pojačati odgovor organizma na povredu lučeći čitav niz citokina.

1.2.2.1. Odgovor mikroglijskih ćelija na traumatsku povredu mozga

Mikroglijske ćelije, jedine stalne fagocitarne ćelije u CNS-u, se u intaktnom tkivu nalaze u mirujućem ('tzv. ramifikovanom') stanju. Ovo predstavlja neaktivno stanje mikroglijskih ćelija, koje se karakteriše malim ćelijskim telom i izuzetnom razgranatošću nastavaka. U svom neaktivnom stanju, mikroglijske ćelije predstavljaju veoma dinamičan i efikasan 'sistem nadzora' mozga. Bilo koja patologija CNS-a, u šta spada i povreda, dovodi do aktivacije mikroglijskih ćelija (Raivich, 2005; Hailer, 2008). Prilikom aktivacije, mikroglijske ćelije povlače svoje nastavke i iz mirujućeg prelaze u aktivirano stanje koje se karakteriše izrazitim morfološkim promenama ovih ćelija (Berry i saradnici, 1999; Fawcett, 2006). Naime, u poslednjim stupnjevima aktivacije mikroglijske ćelije u potpunosti povlače svoje nastavke, ćelijska tela se uvećavaju, a čitava ćelija poprima ameboidni ili okruglasti oblik (Slika 2.).



Slika 2. Shematski prikaz promena mikroglijskih ćelija prilikom aktivacije.

Iako je aktivacija mikroglije sastavni deo odgovora CNS-a na povredu i dalje nije u potpunosti razjašnjeno da li aktivirana mikroglija potpomaže preživljavanje ili dodatno

povećava obim oštećenja tkiva CNS-a nakon povrede. I dok neki rezultati ukazuju na pozitivnu ulogu mikroglijskih ćelija u neuroplastičnim promenama nakon ishemije (Nakajima i saradnici, 2001, Madinier i saradnici, 2009), veliki broj studija je pokazao da mikroglija ima neurotoksična svojstva (Brown, 2007; Brown i Neher, 2010). Kao dokaz za ove tvrdnje poslužile su i studije koje se bave ispitivanjem uticaja imunosupresivne terapije na procese nakon povrede CNS-a (Hailer, 2008; d'Avila i saradnici, 2012). Ove studije su pokazale da imunosupresanti dovode do inhibicije aktivacije mikroglije, ali i do neuroprotekcije nakon traumatske ili ishemijske povrede CNS-a.

Neuroni koji su oštećeni ili se nalaze u procesu ćelijske smrti izazivaju aktivaciju mikroglije (Block i saradnici, 2007). Ovaj podatak ukazuje na to da su mikroglijske ćelije senzori patologije i smrti nervnih ćelija (Kreutzberg, 1996). Aktivirana mikroglija fagocitira proteine oštećenih neurona, ispoljava ove neuronalne epitope na svojoj površini i produkuje proinflamatorne citokine i toksične molekule (Giulian i saradnici, 1994 a, b). Pretpostavlja se da upravo ti agensi dodatno pogoršavaju stanje tkiva, jer dovode do prekomerne sinaptičke aktivnosti, što vodi daljem širenju sekundarne povrede i smrti neurona u okolnom tkivu (Bruce-Keller, 1999; Block i saradnici, 2007). Imajući u vidu da mikroglija brzo reaguje na oštećenje neurona i ima jak uticaj kako na neurone, tako i na astrocite i oligodendrocite (Bruce-Keller, 1999; Nicholas i saradnici, 2002), mikroglijske ćelije potencijalno mogu igrati ključnu ulogu u orkestriranju čitave kaskade događaja koji se nalaze u osnovi sinaptičke plastičnosti i oštećenja nakon povrede.

1.2.2.2. Uloga TNF- α u procesima inflamacije nakon TBI

Smatra se da su proinflamatorni citokini najvećim delom odgovorni za širenje sekundarne povrede. Faktor nekroze tumora (*engl.* tumor necrosis factor, TNF) je citokin sa plejotropnim efektima, a sintetiše se u uslovima infekcije, povrede ili ishemije. Mikroglija (Sawada i saradnici, 1989), astrociti (Sawada i saradnici, 1989) i ependimske ćelije horoidnog pleksusa (Tarlow i saradnici, 1993) su glavni izvor ovog citokina u CNS-u. TNF- α nastaje od prekursora, transmembranskog TNF- α (mTNF), koji se ispoljava na površini ćelije kao protein od 26 kDa (Bazzoni i Beutler, 1996). Nakon obrade od strane metaloproteinaza, kao što je TACE (*engl.* TNF- α -converting enzyme), oslobađa se solubilna forma TNF- α (sTNF) od 17 kDa. Solubilni i transmembranski TNF koegzistiraju kao mono, di ili trimerni proteini, a biološki su aktivni samo trimerni agregati proteina (Black i saradnici, 1997). TNF- α ostvaruje svoje biološke uloge interakcijom sa TNF receptorom 1

ili TNF receptorom 2 (TNFR1 i TNFR2). U cirkulaciji se ova solubilna forma TNF- α nalazi u obliku homotrimeru od 51 kDa.

U intaktnom CNS-u neuroni su jedini ćelijski tip koji produkuje TNF- α protein i to u veoma malim količinama (Breder i saradnici, 1993), dok se ovaj protein ne detektuje u mirujućoj mikrogliji i neaktivnim astrocitima (Mizuno i saradnici, 2003). Međutim, nakon povrede najpre dolazi do jake indukcije TNF- α proteina u neuronima (1-4 sata nakon povrede) (Minami et al., 1991; Taupin et al., 1993; Bruce et al., 1996), što predstavlja okidač za aktivaciju i proliferaciju okolnih mikroglijskih ćelija. Ove ćelije zatim nastavljaju da eksprimiraju TNF- α kao deo održavanja i pojačavanja inflamatorne kaskade (2-5 dana nakon povrede) (Bruce-Keller A, 1999; McCoy and Tansey, 2008). Mikroglijski TNF- α može pokrenuti i aktivaciju astrocita delujući preko njihovih receptora za citokine, posebno preko TNF- α receptora (Zhang i saradnici, 2010). Aktivirani astrociti zatim počinju da eksprimiraju TNF- α i uz mikrogliju predstavljaju glavni izvor ovog citokina (Munoz-Fernandez i Fresno, 1998; Neuman i saradnici, 2002) Takođe, treba naglasiti da TNF- α u mikroglijskim i astrogljijskim ćelijama indukuje kako sopstvenu sintezu, tako i sintezu drugih citokina. Na taj način ove glijske ćelije postaju glavni izvor velikih količina citokina nakon povrede, što ih čini glavnim propagatorima inflamacije i sekundarne povrede.

Interesantno je da TNF- α na ćelijama različitih tipova u CNS-u izaziva različite efekte u pogledu proliferacije i/ili preživljavanja. Iako je pokazano da ovaj citokin aktivira i indukcije proliferaciju astrocita (Selmaj i saradnici, 1990), njegov efekat na neurone i oligodendrocite drastično se razlikuje. Naime, visoke koncentracije TNF- α proteina su se pokazale kao toksične kako za neurone u kulturi (Araujo i saradnici, 1992) tako i za oligodendrocite (Selmaj i Raine, 1988). Kao direktna posledica inflamatornog odgovora u mozgu javlja se oštećenje neurona. Naime, pokazano je da se odsustvo neurofilamenata oko same lezije javlja već par dana nakon injiciranja proinflamatornog agensa (Fitch i saradnici, 1999). Smatra se da se upravo prekomerna produkcija TNF- α proteina nalazi u osnovi patoloških promena nakon povrede CNS-a.

1.2.2.3. Sekundarna ćelijska smrt nakon TBI

Ćelije koje su oštećene mehanički u toku same primarne povrede, najčešće odumiru u satima nakon povrede. Na ovaj način propadne izvestan broj ćelija, ali se smatra da usled pokretanja i širenja procesa inflamacije naknadno odumire daleko veći broj ćelija nego usled primarne povrede. Ova pojava je opisana kao sekundarna ćelijska smrt. Naime,

pokazano je da interakcija TNF- α proteina sa TNFR1 može dovesti do pokretanja programirane ćelijske smrti, odnosno apoptoze (Baud i Karin, 2001; Pickering i saradnici, 2005). Među brojnim poznatim regulatorima i efektorima apoptoze, familija citoplazmatskih proteaza – kaspaza, može igrati veoma bitnu ulogu u fazama otpočinjanja i izvršenja programirane ćelijske smrti (Villa i saradnici, 1997). Do sada je opisano 14 kaspaza (Stroh i Schulze-Osthoff, 1998; Porter i Jänicke, 1999), ali je utvrđeno da je kaspaza-3, član *Ced-3* podfamilije, egzekutorska kaspaza u procesu apoptoze neurona (Kuida i saradnici, 1996; Armstrong i saradnici, 1997; Keane i saradnici, 1997). Kaspaze se sintetisu kao neaktivni prekursorski molekuli, koji se nakon sinteze nalaze u citoplazmi, a aktiviraju se proteolitičkim isecanjem (Walker i saradnici, 1994). Zbog svoje uloge u procesima programirane ćelijske smrti, kaspaza-3 je ključna za normalno razviće mozga. Naime, pokazano je da nokaut miševi za kaspazu-3 imaju upečatljiv fenotip koji se karakteriše defektima lobanje usled pojave ektopičnih masa tkiva mozga, nastalih usled izostanka procesa programirane ćelijske smrti (Porter i Jänicke, 1999). U svim do sada posmatranim ćelijskim tipovima, ekspresija isečene (aktivne) forme kaspaze-3 bila je praćena tipičnim obeležjima apoptoze, kao što su kondenzacija hromatina i fragmentacija DNK (Porter i Jänicke, 1999). Treba napomenuti da je aktivna kaspaza-3 direktno uključena u smrt neurona nakon traumatske povrede mozga (Beer i saradnici, 2000).

1.2.3. Oporavak (dani → nedelje)

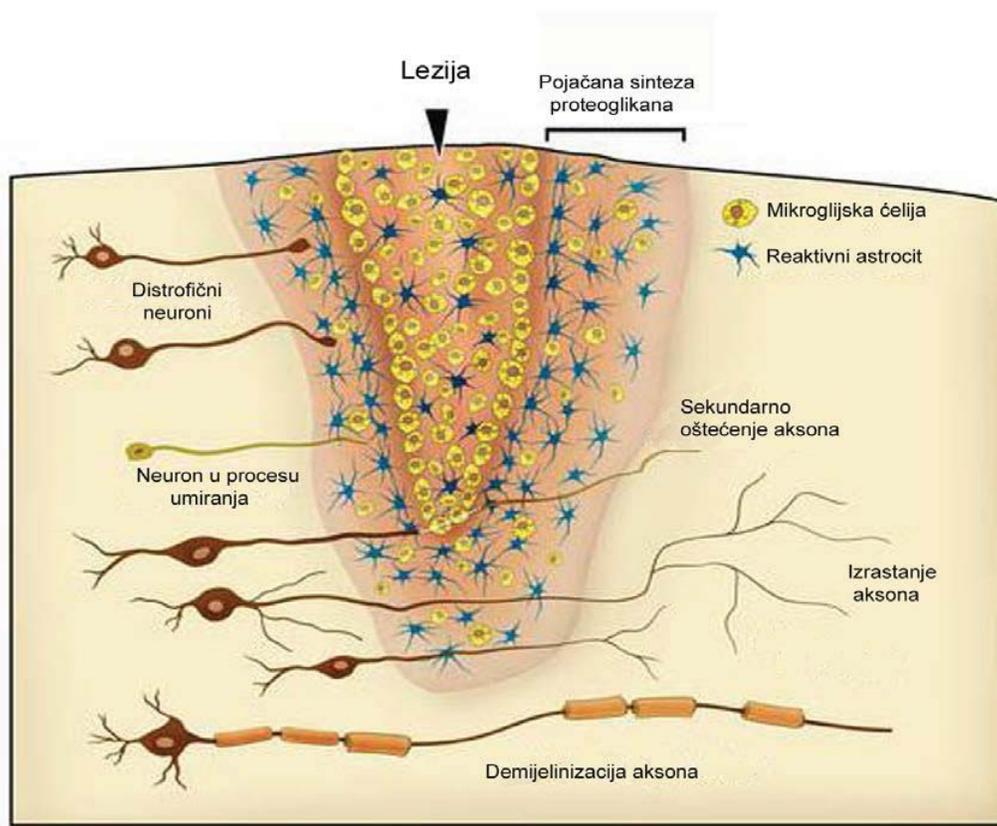
Tokom inflamacije otpornost povređenog tkiva je minimalna, s obzirom na to da tkivo ne može povratiti svoju funkcionalnost sve dok iz faze inflamacije ne pređe u fazu oporavka. Ovaj prelazak dešava se otprilike nedelju dana nakon povrede, a omogućavaju ga makrofagi koji u tom periodu počinju da luče antiinflamatorne molekule. Fazu oporavka karakterišu procesi kao što su umerena regeneracija i izrastanje aksona povređenih neurona i uspostavljanje novih sinapsi. Pored toga, dolazi i do izraženih promena astroglijskih ćelija koje u ovoj fazi igraju veoma značajnu ulogu i od kojih u velikoj meri zavisi ishod oporavka nakon TBI.

1.2.3.1. Uloga astrocита u procesima oporavka nakon povrede

Astrociti predstavljaju najbrojniji tip glijskih ćelija u CNS-u. Otkriveno je da ove ćelije imaju brojne uloge u mozgu kao što su: sinteza i lučenje faktora rasta, pružanje mehaničke podrške neuronima CNS-a, zaštita od ekscitotoksičnosti preuzimanjem viška

glutamata iz sinapse, sinteza i lučenje trofičkih faktora, stvaranje i održavanje krvno-moždane barijere i mnoge druge. Pored toga astrociti imaju ulogu puferskog sistema mozga koji pomaže u kontroli hemijskog sastava vanćelijske sredine (Polikov i saradnici, 2005). Takođe je pokazano da nastavci astrocita ostvaruju kontakt sa neuronima u nivou sinapse i direktno učestvuju u sekreciji i apsorpciji neurotransmitera. Uzimajući u obzir sve navedene činjenice predložen je koncept „trokomponentne sinapse“, koji se odnosi na tesnu vezu koja se u sinapsi uspostavlja između presinaptičke, postsinaptičke i glijske komponente (Araque i saradnici, 1999).

Postoje dva osnovna tipa astrocita u CNS-u: fibrozni i protoplazmatični. Fibrozni astrociti su zastupljeni u beloj masi mozga i karakterišu ih tanki nastavci, dugački i bez grananja. Za razliku od njih, protoplazmatični astrociti su zastupljeni u sivoj masi mozga i karakterišu ih kraći i razgranati nastavci. Tokom faze inflamacije, nakon povrede mozga, astrociti se aktiviraju i ovo stanje karakteriše povećana proliferacija, kao i hipertrofija njihovih ćelijskih tela i nastavaka. Najpre, dolazi do aktivacije astrocita koji se nalaze uz samu povredu i u tkivu koje okružuje povređeni region. U prvim danima nakon povrede aktivirani astrociti migriraju ka oštećenom tkivu. Kada astrociti dospeju na mesto povrede, njihovi nastavci okružuju leziju i čvrsto se prepliću čineći tako barijeru, odnosno glijski ožiljak (Slika 3). Ovaj proces je oznčen kao reaktivna gliozna i karakterišu ga slojevi aktiviranih astrocita koji formiraju jasnu granicu oko povređenog tkiva (Stroncek i Reichert, 2008).



Slika 3: Prikaz događaja u povređenom regionu tokom faze oporavka (preuzeto i modifikovano iz: Fitch i Silver, 2009)

Ukupan obim aktivacije astrocita u izvesnoj meri prati stepen narušavanja krvno-moždane barijere i oštećenja tkiva (Silver i Miller, 2004). Aktivirane astrocite odlikuje i pojačana ekspresija glijskog fibrilarnog kiselog proteina (*engl.* Glial Fibrillary Acidic Protein – GFAP). Nivo GFAP-a je povišen već u prvom satu nakon povrede, a nivo ekspresije ovog proteina je veoma osetljiv marker stepena aktivacije astroglialskih ćelija (Mucke i saradnici, 1991). Međutim, povišen nivo GFAP-a *per se* nije isključivi pokazatelj aktivacije astrocita, s obzirom na to da mikroglajske ćelije mogu fagocitirati fragmente GFAP proteina koji potiču iz nekrotičnih astrocita i tako eksprimirati ovaj protein (Norenberg M, 2005). Upravo zbog toga, morfološko stanje astrocita predstavlja najbolji pokazatelj astroglioze.

Iako astrociti tokom razvića potpomažu rast aksona, produžena aktivacija astrocita postaje štetna za izrastanje aksona (Zhang i saradnici, 2010). Prilikom razmatranja uloge astrocita u procesima oporavka nakon povrede treba imati u vidu brojne funkcije koje oni

obavljaju u netaknutom mozgu, od kojih su neke: preuzimanje viška glutamata iz sinapse, uklanjanje slobodnih radikala, transport vode. Shodno tome, oštećenje ili potpuni gubitak ovih funkcija nakon povrede može kritično uticati na preživljavanje neurona (Chen i Swanson, 2003). Osim gubitka funkcija koje imaju u netaknutom mozgu, astrociti nakon povrede dobijaju i niz novih funkcija koje su povezane sa aktivacijom ovih ćelija. Osim proliferacije i morfoloških promena, reaktivni astrociti migriraju do mesta povrede, formiraju glijski ožiljak i aktivno luče proinflatorne citokine i inhibitorne molekule u vanćelijski prostor.

Smatra se da glijski ožiljak može da očuva funkciju neurona nakon povrede tako što obnavlja narušenu krvno-moždanu barijeru, čime dovodi do ograničavanja inflamatornog odgovora imunskih ćelija CNS-a, odnosno, mikroglije (Silver i Miller, 2004; Norenberg M, 2005). Takođe, glijski ožiljak je povezan i sa procesima uklanjanja glutamata, kao i produkcijom antiinflamatornih citokina (Zurn i Bandtlow, 2006). Pored toga, pokazano je da uklanjanje astrocita ima za posledicu veće širenje povrede i veći stepen neurodegeneracije oko mesta lezije usled nesmetanog širenja ćelija imunskog sistema kroz okolno tkivo (Faulkner i saradnici, 2005). Međutim, pored pozitivnih, glijski ožiljak ima i izrazito negativne strane. Naime, reaktivni astrociti koji formiraju glijski ožiljak sintetišu i izlučuju u vanćelijski prostor inhibitorne molekule, što onemogućava regeneraciju oštećenih aksona. Glijski ožiljak se karakteriše prisustvom velike količine hondroitin-sulfatnih proteoglikana (*engl.* chondroitin sulfate proteoglycans; CSPG) koji su sačinjeni od središnjeg proteina za koji je zakačen različit broj ponovljenih disaharidnih hondroitin-sulfatnih lanaca (Fawcett JW, 2006). CSPG predstavljaju važnu komponentu vanćelijskog matriksa. Ovu grupu molekula čini veliki broj različitih proteoglikana (neurokan, brevikan, fosfakan, agrekan itd.) koje luče različiti tipovi ćelija u mozgu. Smatra se da CSPG imaju važne uloge u morfogenezi i održavanju strukturnog integriteta, jer stupaju u interakciju sa adhezionim molekulima i faktorima rasta (Matsui i Oohira, 2004). Ekspresija CSPG započinje veoma rano u embrionalnom razviću, dostiže maksimum oko rođenja i kasnije opada. Ovakav profil ekspresije poklapa se sa neurogenezom, gliogenezom i sinaptogenezom i ukazuje na uloge CSPG u ovim procesima. Takođe, pokazano je da ovi molekuli imaju dvostruku ulogu kada je u pitanju rast aksona i sinaptogeneza u ranom razviću, odnosno, CSPG mogu podsticati ili inhibirati pomenute procese (Bovolenta i Fernaud-Espinosa, 2000). Dvojaka funkcija CSPG najverovatnije je uslovljena različitim faktorima sa kojima ovi molekuli stupaju u interakcije, uključujući faktore rasta, molekule

vanćelijskog matriksa, molekule ćelijske adhezije i komponente citoskeleta (Bovolenta i Fernaud-Espinosa, 2000). Osim u razviću, CSPG imaju ulogu i u patogenezi bolesti nervnog sistema i nakon povrede (Matsui i Oohira, 2004). Naime, pokazano je da nakon traumatske povrede mozga dolazi do naglog porasta ekspresije ovih molekula (Slika 3) (Schwartz i Domowitz, 2004). Neurokan je jedan od glavnih CSPG vanćelijskog matriksa CNS-a. U fiziološkim uslovima neurokan sintetišu i oslobađaju najvećim delom neuroni, dok ga nakon povrede pojačano oslobađaju astrociti i prekursori oligodendrocita (Matsui i Oohira, 2004). U glijskom ožiljku, reaktivni astrociti i prekursori oligodendrocita sintetišu neurokan kao odgovor na citokine i faktore rasta poreklom iz mikroglije (Asher i saradnici, 2000). Ovo povećanje ekspresije neurokana je zajedničko za sve tipove CNS povreda. Pokazano je da reaktivni astrociti sintetišu neurokan i 30 dana nakon povrede (McKeon i saradnici, 1999). Ekspresija CSPG je najviša u samom centru lezije i smanjuje se sa udaljavanjem od centra lezije (Davies i saradnici, 1999). Već u prvih 24 sata nakon povrede reaktivni astrociti luče CSPG, a povišen nivo ovih molekula može se uočiti i mesecima posle povrede (McKeon i saradnici, 1999; Davies i saradnici, 1999; Silver i Miller, 2004).

Glavna uloga CSPG nakon povrede je inhibicija regeneracije aksona (Galtrey i Fawcett, 2007). Bez obzira da li se radi o molekulima asociranim sa glijskim ožiljkom ili sa mijelinom, inhibicija ponovnog izrastanja aksona se dešava na isti način - preko Rho GTPaznog signalnog puta. Kada se inhibitorni ligandi vežu za receptore konusa rasta, dolazi do aktivacije Rho familije GTPaza i pokretanja unutarćelijskog signalnog puta koji, blokiranjem povezivanja mikrotubula, dovodi do kolapsa konusa rasta aksona (Sandvig i saradnici, 2004).

Ćelije koje formiraju glijski ožiljak, sprečavaju izrastanje neurona stvaranjem nepermisivnog miljea (Slika 3). Pretpostavlja se da glijski ožiljak, osim što štiti tkivo CNS-a od daljeg širenja povrede, ima ulogu i u sprečavanju neurona da formiraju neodgovarajuće veze nakon povrede (Davies i saradnici, 1996; Davies i saradnici, 1999). Međutim, kako ne postoji mogućnost selektivnog blokiranja samo neodgovarajućih veza, krajnji rezultat je blokiranje izrastanja svih aksona, kao i onemogućavanje nastanka bilo kojih veza. Sve to za posledicu ima veća ili manja, ali u svakom slučaju nepovratna oštećenja povređenog regiona, jer bez preživljavanja neurona, njihove regeneracije i formiranja novih veza, povređeni deo CNS-a zauvek gubi funkcionalnost (Stroncek i Reichert, 2008).

Poznato je da i Švanove ćelije kao i astrociti u CNS-u proliferišu i prelaze u aktivno stanje nakon povrede (Stroncek i Reichert, 2008). Glavna razlika između PNS-a i CNS-a je

ta da iako Švanove ćelije trpe morfološke i hemijske promene, te promene čine da one aktivno pomažu regeneraciji aksona, dok aktivirani astrociti sintetišu i luče inhibitorne molekule koji sprečavaju regeneraciju aksona. Smatra se da upravo ova razlika u ponašanju glijjskih ćelija PNS-a i CNS-a čini da PNS predstavlja permisivnu, a CNS nepermisivnu sredinu za izrastanje aksona. Naime, pokazano je da su aksoni neurona CNS-a sposobni za potpunu regeneraciju kroz graftove tkiva PNS-a, ukoliko se oni implantiraju van CNS-a (David i Aguayo, 1981).

Mehanizmi koji dovode do aktivacije astrocita nisu u potpunosti razjašnjeni, ali se dugo smatralo da oštećeni neuroni indukuju astrogliozu, a sama astroglioza je korišćena kao indeks oštećenja neurona (Zhang i saradnici, 2010). Međutim, veliki broj studija ukazuje na to da citokini i drugi solubilni produkti koje oslobađaju aktivirane mikroglijске ćelije, mogu u značajnoj meri uticati na aktivaciju astrocita kao i na formiranje glijjskog ožiljka nakon povrede CNS-a (Zhang i saradnici, 2010). Hipoteza da mikroglija pokreće i održava astrogliozu ukazuje na to da bi smanjenje prekomerne aktivacije mikroglije moglo efikasno da umanjí reaktivnu astrogliozu. Razvoj ciljane terapije koja bi sprečila aktivaciju mikroglije mogla bi usporiti ili u potpunosti zaustaviti proces astroglioze i na taj način pomoći u postizanju povoljnijeg okruženja za povređene neurone u različitim patologijama CNS-a.

1.2.3.2. Procesi oporavka CNS-a nakon povrede

Povreda mozga dovodi do oštećenja aksona i ćelijskih tela neurona, što onemogućava signalnu transdukciju na sinapsama (Emery i saradnici, 2003). Upravo zbog toga, plastičnost mozga, kao i mehanizmi koji kontrolišu plastičnost, igraju centralnu ulogu u procesu oporavka nakon povrede i presudni su za uspešnost ovog procesa. Za razliku od PNS gde se povređeni aksoni mogu u potpunosti regenerisati pod povoljnim uslovima, regenerativna sposobnost aksona u adultnom CNS-u je veoma ograničena. Regeneracija neurona nakon povrede se u adultnom CNS-u najčešće svodi na reorganizaciju citoskeleta i izduživanje aksona. Protein koji ima važnu ulogu u ovim procesima je **GAP-43** (*engl.* growth-associated protein-43; GAP-43), kiseli protein lokalizovan na citoplazmatskoj strani ćelijske membrane nervnih završetaka. Tačna uloga GAP-43 u procesima plastičnosti nije u potpunosti razjašnjena. Iako se na osnovu studija sa prekomernom ekspresijom GAP-43 proteina pretpostavilo da može imati direktnu ulogu u inicijaciji rasta aksona (Aigner i saradnici, 1995), na GAP-43 ^{-/-} miševima je pokazano da i u odsustvu ovog proteina

dolazi do izrastanja aksona (Strittmatter i saradnici, 1995; Maier i saradnici, 1999). Danas se ovaj protein smatra važnim za “prevođenje” signala u aksonima, tj. kao spona između aktina i različitih membranskih kompleksa. Sve je verovatnije da se GAP-43 nalazi na mestu ukrštanja signalnih puteva koji mogu dovesti do rasta aksona, ili pak, do indukcije apoptoze i smrti neurona, posredujući tako direktno u odgovoru neurona na povoljne i nepovoljne uslove sredine. Odavno je poznato da prilikom povećane ekspresije GAP-43 proteina u prisustvu ciljnih neurona, i, verovatno trofičkih faktora koje oni luče, dolazi do izrastanja aksona i uspostavljanja novih sinapsi, dok u slučaju njihovog odsustva dolazi do intenzivnog propadanja neurona (Wehrle i saradnici, 2001). Upravo zbog toga GAP-43 se naziva ‘proteinom plastičnosti’. Ovaj protein je u visokim koncentracijama zastupljen u konusima rasta neurona tokom razvića, tokom regeneracije aksona i nakon procesa učenja. Bilo koji proces koji podrazumeva remodelovanje membrane aksona, kao što je rast neurita, gotovo uvek je povezan sa povećanom ekspresijom GAP-43 proteina (Hulsebosch i saradnici, 1998). Iako je sama ekspresija GAP-43 proteina dovoljna za pokretanje rasta aksona, smatra se da ona nije dovoljan uslov da bi došlo i do potpune funkcionalne regeneracije oštećenih aksona. Budući da funkcije mozga direktno zavise od broja i funkcionalnosti sinapsi, u osnovi oštećenja koja nastaju kao posledica povrede CNS-a najčešće se nalazi upravo sinaptička disfunkcija. Kao odgovor na povredu CNS-a, preživeli neuroni reorganizuju svoje veze i formiraju nove sinapse kako bi nadomestili sinapse izgubljene prilikom povrede (Becher i saradnici, 1999). Upravo zato, smatra se da je za potpuni regenerativni program neophodna i ekspresija proteina neophodnih za normalno funkcionisanje sinapse (Strata i saradnici, 1999).

Sinaptofizin (SPH) je glavni integralni protein membrana malih sinaptičkih vezikula nervnih i neuroendokrinih ćelija (Sudhof i saradnici, 1987). Sinaptofizin je prvi identifikovani protein nervnih završetaka (Jahn i saradnici, 1985; Wiedenmann i Franke, 1985) i visoko je zastupljen u presinaptičkim završecima neurona u većini, ako ne i u svim regionima u mozgu (Jahn i saradnici, 1985). S obzirom na to da je isključivo lokalizovan u sinaptičkim vezikulama, ovaj protein se koristi kao marker presinaptičke oblasti. Tokom razvića nervnog sistema sinaptofizin se javlja u vreme intenzivne sinaptogeneze (Grunnet, 1995), a relativan sadržaj sinaptofizina u periodu od rođenja do adultnog doba kod miša, poveća se i do 80 puta (Knaus i saradnici, 1986). Međutim, uočeno je da se odsustvo ovog proteina ne odražava značajno na funkcionisanje nervnog sistema (Eshkind i Leube, 1995; McMahon i saradnici, 1996). Tačna funkcija sinaptofizina još uvek nije u potpunosti

razjašnjena. Izgleda da je sinaptofizin pre svega strukturni protein, bitan za specifičnost membrana sinaptičkih vezikula zahvaljujući kojoj je sprečeno njihovo mešanje sa ćelijskom membranom u toku procesa egzocitoze (Proper i saradnici, 2000). Takođe, smatra se da SPH ima ulogu u aktivno-zavisnom kompetitivnom formiranju sinapsi (Tarsa i Goda, 2002). Sinaptofizin je u brojnim studijama korišćen kao marker promena u sinaptičkoj gustini. Kvantitativna analiza ovih promena bazira se na pretpostavci da je količina sinaptofizina unutar završetka konstantna usled recikliranja vezikula (Walaas i saradnici, 1988) i da će se, zbog njegove visoke zastupljenosti u presinaptičkom regionu, promene u broju sinapsi prevashodno odraziti na količinu sinaptofizina. U skladu sa tim, pokazano je da sinaptofizina ima manje u kori mozga starih pacova (Saito i saradnici, 1994), kao i da LTP prati povećanje količine sinaptofizina (Mullany i Lynch, 1997). Studija Nakamure i saradnika (1999) ukazala je, međutim, da povećanje količine sinaptofizina, uočeno kod starih pacova nakon boravka u obogaćenoj sredini, ne mora predstavljati samo povećanje broja prisutnih sinapsi, već i povećanje broja vezikula po presinaptičkom završetku.

1.2.4. Remodelovanje (nedelje → meseci)

U ovom periodu mikroglia i makrofagi su u potpunosti uklonili fibrinski ugrušak, kao i nekrotične neurone i glijske ćelije unutar lezije (Clark i saradnici, 1993). Kada se ovaj proces 'čišćenja' lezije završi, mikroglia i makrofagi podležu apoptozi, ostavljajući u centru lezije, tamo gde se prvobitno dogodila povreda, cistu ispunjenu cerebrospinalnom tečnošću (Clark i saradnici, 1993). Cista je ograničena tankim, kompaktnim slojem reaktivnih astrocita.

U CNS-u, gde su oporavak i regeneracija povređenih neurona veoma ograničeni, ponovno uspostavljanje strukturnog integriteta regiona je relativno slabo. Umesto toga, tokom faze remodelovanja CNS-a, dolazi do nagomilavanja astrocita oko same lezije, pa glijski ožiljak postaje kompaktniji i deblji (Turner i saradnici, 1999). Prevhodna svrha formiranja ovakvog ožiljka jeste zaštita CNS-a od jakog imunog odgovora organizma. Iako ovaj ožiljak u većoj ili manjoj meri izoluje povređeni region od spoljnih uticaja, zbog postojanja inhibitornih molekula unutar ožiljka aksoni neurona koji se nalaze van glijskog ožiljka ne mogu izrastati kroz samu povredu, što dovodi do nepovratnog gubitka funkcije oštećenog regiona (Stroncek i Reichert, 2008).

1.3. Dijetalna restrikcija

Dijetalna restrikcija (DR) je režim ishrane uz smanjeni unos hrane, bez pothranjenosti. Termin „dijetalna restrikcija“ podrazumeva činjenicu da su sve komponente hrane redukovane, a ne samo broj kalorija (Masoro, 2009). Postoje dva osnovna obrasca restriktivnog režima ishrane koji se široko primenjuju zbog svoje sposobnosti da produže životni vek miševa i pacova. Intermitentna dijeta (*engl.* intermittent fasting, IF) podrazumeva smenjivanje perioda gladovanja i perioda *ad libitum* (AL) ishrane koji traju svaki po 24 sata (Marinković i saradnici, 2007). U drugom obrascu životinje dobijaju hranu svakoga dana, ali je njihov dnevni unos manji za 20-50% od normalnog dnevnog unosa hrane *ad libitum* životinja. Pokazano je da je stepen pozitivnih efekata dijetalne restrikcije proporcionalan procentu redukcije hrane. Redukcija od 50% normalnog dnevnog unosa hrane pokazuje najbolje efekte, dok veći stepen redukcije od pomenutog dovodi do pothranjenosti i ima negativne efekte na čitav organizam (Matson, 2003). Analizom različitih fizioloških parametara, kod životinja držanih na oba pomenuta režima ishrane, pokazano je da oni imaju veoma slične efekte na organizam (Martin i saradnici, 2006). Takođe, pokazano je da oba režima ishrane imaju povoljan uticaj na mozak.

1.3.1. Efekti dijetalne restrikcije

Već decenijama je poznato da smanjenje unosa hrane povoljno deluje na organizam tako što odlaže starosno-zavisne fiziološke promene i smanjuje incidencu različitih obolenja kao što su kancer, autoimunske bolesti, Parkinsonova i Alchajmerova bolest, itd. (Mattson MP, 2005; Kouda i Iki, 2010). Takođe, pokazano je da se životni vek različitih organizama, uključujući kvasce, crve, glodare i majmune, može povećati za čak 50% jednostavnom redukcijom unosa kalorija (Weindruch i Sohal, 1997; Lin i saradnici, 2000; Sze i saradnici, 2000).

Neke od najranijih studija bavile su se uticajem restrikcije hrane na kontrolu motoričkih funkcija i procese učenja i pamćenja tokom starenja. (Mattson i saradnici, 2003). Restrikcija hrane je uspela da umanja ili u potpunosti spreči deficite u motoričkim funkcijama i senzomotornoj koordinaciji, kao i da poboljša rezultate na testovima učenja i pamćenja (Ingram i saradnici, 1987; Idrobo i saradnici, 1987; Dubey i saradnici, 1996). Takođe, pokazano je da DR ima uticaj i na neurotransmitterske sisteme kod starih životinja tako što sprečava promene nivoa dopamina i serotonina u kori prednjeg mozga pacova (Yeung i Friedman, 1991), kao i nakupljanje dopamina u strijatumu starih pacova (Diao i

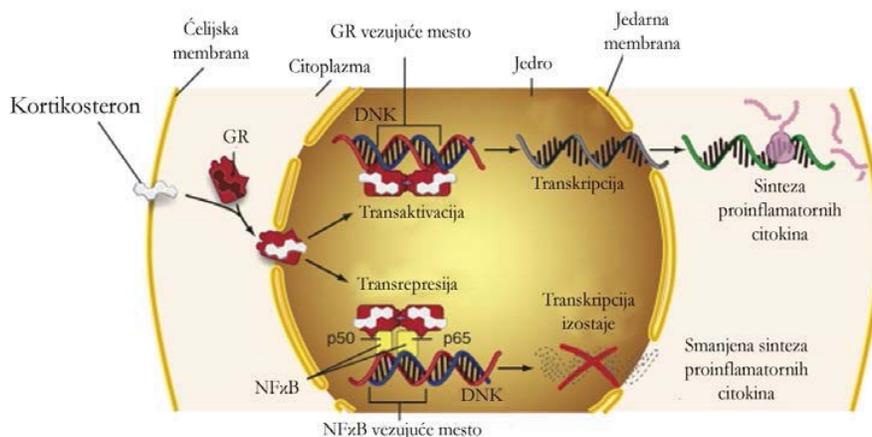
saradnici, 1997). Ispitivan je i uticaj različitih režima ishrane na funkcije sinapsi nakon izlaganja oksidativnom i metaboličkom stresu (Guo i saradnici, 2000). Tokom starenja DR podstiče ekspresiju proteina sinaptičke plastičnosti i stabilise nivo ovih proteina (Ando i saradnici, 2002; Mladenović Đorđević i saradnici, 2010) i menja stosno-zavisne promene u metabolizmu holesterola (Perović i saradnici, 2009) u korteksu i hipokampusu pacova. Pored toga, DR može da spreči neurodegeneraciju, ali i da poveća neurogenezu u mozgu adultnih miševa i pacova (Lee i saradnici, 2000, 2002a,b). Dijetalna restrikcija se sve češće razmatra kao deo terapije kod pacijenata obolelih od neurodegenerativnih obolenja, jer je pokazano da ima neuroprotektivno dejstvo kod pacijenata obolelih od Alchajmerove i Parkinsonove bolesti (Love, 2005). Takođe, DR smanjuje šansu pojave moždanog udara kod spontano hipertenzivnih pacova (Chiba i Ezaki, 2010) i ima sposobnost da suprimira sistemsku inflamaciju nakon šloga, što za rezultat ima bolji funkcionalni oporavak (Arumugam i saradnici, 2010).

1.3.2. Mehanizmi delovanja dijetalne restrikcije

Dijetalna restrikcija je do danas jedini eksperimentalni pristup za koji je pokazano da odlaže ili u potpunosti sprečava pojavu određenog broja starosno-zavisnih promena i to u različitim model–organizmima, od kvasca do sisara (Masoro, 2000; Civitarese i saradnici, 2007; Guarente, 2008). Predložen je veći broj mehanizama kojima dijeta postiže pozitivne efekte, a najčešće promene podrazumevaju: a) koordinisani porast ekspresije gena uključenih u energetske metabolizam mitohondrija; b) pojačanu osetljivost insulinskog signalnog puta; c) smanjenje oksidativnog stresa; d) redukciju nivoa hormona koji regulišu termogenezu i ćelijski metabolizam; e) redukciju nivoa anaboličkih hormona; f) povišene koncentracije adiponektina u cirkulaciji; g) hormeza. Pretpostavlja se da na molekularnom nivou DR ispoljava svoje dejstvo preko aktivacije sirtuina, porasta ekspresije i aktivnosti transkripcionog aktivatora PGC-1 α i inhibicije mTOR signalnog puta (Speakman i Mitchell, 2011; Srivastava i Haigis, 2011). Ni za jedan od predloženih mehanizama ne postoje nesumnjivi dokazi, ali se pretpostavlja da delovanje dijetalne restrikcije uključuje kombinaciju metaboličkih, fizioloških i ćelijskih adaptacija. Analiza različitih mehanizama, pak ukazuje da su svi oni ukorenjeni u odgovoru na smanjeni unos energije i da kroz 'reprogramiranje metabolizma' dovode do uspostavljanja potpuno novog metaboličkog stanja.

Jedna od najčešće predlaganih hipoteza jeste da upravo smanjena dostupnost energije deluje kao stresor koji podiže odbrambeni nivo same ćelije i na taj način štiti sistem od naknadnih jačih stresora, kao što je povreda mozga (Heydari i saradnici, 1996; Latchman, 1995; Masoro, 2007; Sharma i Kaur, 2005, 2008; Kouda i Iki, 2010). Smatra se da upravo ovaj mehanizam leži u osnovi boljeg oporavka nakon povrede CNS-a, koji je uočen kod životinja na dijetalnoj restrikciji. Ovaj vid profilaktičkog tretmana označen je kao **prekondicioniranje**, a odgovor organizma na ovu vrstu tretmana definisan je kao **hormeza**. Hormeza (od grčkog *hórmēsis* - “pokrenuti, nagoniti, prisiliti”) je definisana kao povoljan biološki odgovor organizma na izlaganje blagim stresorima.

Pokazano je da stres izazvan promenama u ishrani kao što su post, izgladnjivanje ili hipoglikemija indukovana insulinom, dovodi do porasta nivoa 'hormona stresa' – glukokortikoidnog hormona u serumu. (Marinković i saradnici, 2007; Patel i Finch, 2007). Smatra se da DR upravo delujući kao blagi stresor, pokreće mehanizme odbrane koji deluju protektivno (Leakey i saradnici, 1998; Sharma i Kaur, 2005). Studije na životinjama su pokazale da restrikcija hrane ispoljava antiinflamatorne i antineoplastične efekte koji su u skladu sa hroničnim pojačanim oslobađanjem kortikosterona (KORT) (Klebanov i saradnici, 1995; Lal i saradnici, 1995; Frame i saradnici, 1998). Antiinflamatorni efekti glukokortikoida se ostvaruju preko dva komplementarna mehanizma: indukcije smrti ćelija koje pokreću inflamaciju i zaustavljanje apoptotskih signala, što za posledicu ima zaštitu ćelija tkiva zahvaćenog inflamacijom (Amsterdam i saradnici, 2002; Amsterdam i Sasson, 2002).



Slika 4. Signalni putevi koji se pokreću nakon vezivanja kortikosterona za glukokortikoidni receptor: dvostruko dejstvo GR u ćeliji.

Svoje dejstvo glukokortikoidi ostvaruju preko glukokortikoidnog receptora (GR). Kada se KORT veže za receptor, pokreće se jedan od dva puta (Slika 4). Naime, aktivirani GR kompleks može ili povećati ekspresiju antiinflamatornih proteina u jedru (*transaktivacija*) ili sprečavati ekspresiju proinflamatornih proteina onemogućavajući transkripciju proinflamatornih gena kroz direktnu protein-protein interakciju sa proinflamatornim transkripcionim faktorima (*transrepresija*) (Limbourg i Liao, 2003). Jedan od transkripcionih faktora sa kojim aktivirani GR receptor može stupiti u interakciju i tako modulirati ćelijski odgovor jeste i jedarni faktor- κ B (*engl.* Nuclear factor- κ B; NF- κ B) koji igra jednu od glavnih uloga u regulaciji procesa inflamacije i apoptoze. Smatra se da se predloženi mehanizam nalazi u osnovi povoljnih uticaja dijetalne restrikcije, kako na procese oporavka nakon traumatske povrede mozga, tako i na sve ostale aspekte zaštite organizma od nepovoljnih uticaja sredine. Međutim, tačan mehanizam ili mehanizmi, povoljnih uticaja dijetalne restrikcije još uvek nisu u potpunosti rasvetljeni.

1.3.3. Efekti dijetalne restrikcije na procese oporavka nakon TBI

U poslednjih desetak godina intenzivno se istražuje uticaj smanjenog unosa hrane na procese oporavka nakon povrede. Dosadašnja istraživanja na ovom polju su pokazala da restrikcija hrane u trajanju od nekoliko meseci pre povrede CNS-a ima neuroprotektivno dejstvo i podstiče funkcionalni oporavak u nekoliko različitih modela povrede. Naime, pokazano je da intermitentna dijeta kao pretretman u trajanju od 3 meseca povećava nivo proteina toplotnog stresa 70 (*engl.* heat shock protein 70, Hsp70) i adhezionih molekula, dok snižava nivo GFAP proteina u mozgu nakon oštećenja kainičnom kiselinom (Sharma i Kaur, 2005, 2007). Takođe, pokazano je da isti tip dijetne smanjuje proliferaciju mikroglijskih ćelija nakon aplikacije kainične kiseline (Lee i saradnici, 2003). Pokazano je da intermitentna dijeta u trajanju od 2 do 4 meseca povećava opštu otpornost hipokampalnih i strijatalnih neurona na degeneraciju izazvanu toksinima (Bruce-Keller i saradnici, 1999). Takođe, pokazano je da redukcija dnevnog unosa hrane za samo 30% u trajanju od 5 meseci pre povrede dovodi do povećanja nivoa trofičkog proteina poreklom iz mozga (*engl.* brain derived neurotrophic factor, BDNF), smanjuje veličinu povređenog regiona i dovodi do boljeg funkcionalnog oporavka nakon traumatske povrede mozga (Rich i saradnici, 2010). Novija istraživanja su pokazala da dijetalna restrikcija može imati i kliničku primenu. Naime, pokazano je da dijetalna restrikcija primenjena nakon povrede kičmene moždine ima neuroprotektivno dejstvo, povećava plastičnost povređenog regiona i poboljšava

funkcionalni oporavak (Plunet i saradnici, 2008). Noviji podaci su pokazali da je čak i relativno kratka preoperativna dijetalna restrikcija u trajanju od samo 4 dana, modifikovala izvesne aspekte postoperativnog inflamatornog odgovora (van Ginhoven i saradnici, 2011).

Međutim, još uvek nije dovoljno ispitano u kojoj meri dijetalna restrikcija može uticati na različite aspekte sekundarne povrede, kao i da li i u kojoj meri može suprimirati sekundarnu ćelijsku smrt nakon traumatske povrede mozga. Odgovori na ova pitanja mogu biti od suštinskog značaja, posebno ukoliko se dijetalna restrikcija posmatra kao potencijalni klinički tretman.

2. Ciljevi rada

Dijetalna restrikcija se već decenijama nalazi u fokusu istraživanja kao potencijalni tretman za prevenciju bolesti, ali i za produžetak životnog veka kako životinja, tako i čoveka. Međutim, efekti dijetalne restrikcije na procese oporavka nakon traumatske povrede mozga još uvek nisu u potpunosti ispitani. Shodno tome, cilj ove teze je bio da se detaljno ispita uticaj dijetalne restrikcije na procese sekundarne povrede, sekundarne neurodegeneracije, kao i na procese plastičnosti povređenog regiona senzomotorne kore prednjeg mozga pacova, tokom perioda oporavka od 2-28 dana nakon povrede. U skladu sa tim definisani su sledeći neposredni zadaci istraživanja:

1. Ispitati uticaj DR na biohemijske parametre u serumu (koncentracija glukoze i kortikosterona);
2. ispitati uticaj DR na procese inflamacije, praćenjem morfoloških karakteristika mikroglijskih ćelija i sinteze TNF- α proteina kao glavnog proinflamatornog citokina ovih ćelija ;
3. ispitati uticaj DR da utiče na proces sekundarne neurodegeneracije u povređenoj kori mozga pacova;
4. ispitati uticaj DR na procese neuronalne plastičnosti u povređenom tkivu kore mozga;
5. ispitati uticaj DR na morfološka i hemijska svojstva astroglijskih ćelija nakon povrede;
6. ispitati da li DR deluje kao stresor i shodno tome, da li dovodi do promene nivoa proteina direktno uključenih u odgovor na stres;
7. ispitati da li DR kao pretretman utiče na pokretanje antiapoptotskih signala u povređenom regionu kore mozga pacova.

3. Materijal i metode

3.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentu je korišćeno 80 mužjaka pacova soja *Wistar* (starosti 3 meseca) iz vivarijuma Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković". Životinje su gajene u standardnim uslovima (temperatura: $23 \pm 2^\circ\text{C}$; relativna vlažnosti vazduha: 60-70%; svetlosni režim 12 sati svetlost / 12 sati mrak; slobodan pristup vodi; n=3 životinje po kavezu). Svi eksperimenti su odobreni od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja u Beogradu (rešenje broj: 26/06).

3.2. Restrikcija hrane

Za potrebe eksperimenta, izmeren je prosečni dnevni unos hrane pacova starih 3 meseca i utvrđeno je da on iznosi 24g standardne briketirane hrane dnevno po pacovu. Životinje su podeljene u dve grupe, označene kao *ad libitum* životinje (AL, n=40) i životinje na dijetalnoj restrikciji (DR, n=40). Životinje iz AL grupe imale su neograničen pristup hrani tokom trajanja eksperimenta. Životinje iz DR grupe su dobijale 50% normalnog dnevnog unosa hrane (12 g standardne briketirane hrane dnevno po pacovu); hrana je davana u 12:00 h svakoga dana. Obe grupe životinja imale su neograničen pristup vodi tokom trajanja eksperimenta. Imajući u vidu da se potreba za hranom povećava tokom života životinja, dnevni unos hrane je meren jedan put mesečno u AL grupi životinja, kako bi se obezbedilo da životinje koje su na restriktivnom režimu ishrane unose odgovarajuću količinu hrane dnevno. Na kraju eksperimenta, prosečni dnevni unos hrane AL životinja iznosio je 28 g hrane dnevno po pacovu. Shodno tome, dnevni unos hrane DR životinja iznosio je 14 g hrane dnevno po pacovu. Telesna težina životinja u obe grupe (AL i DR) merena je svake druge nedelje. Pacovi iz DR grupe držani su na restriktivnom režimu ishrane 3 meseca pre operacije, kao i tokom perioda oporavka nakon operacije (tj. 2, 7, 14 ili 28 dana).

3.3. Povreda kore prednjeg mozga

Operacija je izvršena na pacovima starosti 6 meseci. Životinje su anestetizirane Nembutalom (50 mg/kg, Serva) i postavljene u stereotaksički ram. Zatim je životinjama obrijan skalp i načinjen rez duž središnjeg dela skalpa kako bi se izložio predeo Bregme. Ubodne lezije napravljene su pomoću stomatološkog borera promera 1 mm, jednostrano u senzomotornom regionu kore prednjeg mozga. Borer je uveden 2 mm ispod površine

lobanje u region kore velikog mozga. Koordinate lezija bile su sledeće: prva lezija: 1mm posteriorno od Bregme , 2mm lateralno od središnje linije; druga lezija: 2 mm posteriorno od Bregme, 1 mm lateralno od središnje linije; treća lezija: 4 mm posteriorno od Bregme, 2 mm lateralno od središnje linije (Ivković i saradnici, 1994). Nakon operacije životinje su 3 sata provele u izolaciji, dok se nisu u potpunosti oporavile od anestezije, a zatim su vraćene u svoje kaveze (n=3) kako bi se izbegao stres usled socijalne izolacije.

3.4. Eksperimentalna procedura

Fiziološke kontrole (označene kao: kontrola) za obe grupe životinja (AL i DR) žrtvovane su bez ikakvog operativnog tretmana. Ostale AL i DR životinje podvrgnute su operaciji, a zatim su formirane grupe u zavisnosti od trajanja perioda oporavka nakon lezije. Životinje su žrtvovane u različitim vremenskim tačkama (kontrola, 2, 7, 14. i 28. dan nakon lezije; n=8 životinja po grupi).

3.4.1. Izolacija tkiva

Ipsilateralna kora mozga u odnosu na mesto lezije je izolovana na hladnoj površini, kako bi se ublažilo dejstvo proteolitičkih enzima. Uzorci kore mozga su pulovani (n=5 životinja za svaku vremensku tačku AL i DR grupe). Proteini i RNK su izolovani iz istog homogenata. Uzorci tkiva su do trenutka izolacije čuvani na -80°C. Za histološko bojenje i imunohistohemijsku analizu izolovani su **celi mozgovi** (n=3 životinje po vremenskoj tački). **Izolacija seruma** izvršena je centrifugiranjem prikupljene krvi eksperimentalnih životinja (15 minuta na 1500 rpm). Serum je dekantovan i do dalje analize čuvan na -20°C. **Izolacija nadbubrežnih žlezda** vršena je operativnim putem, otvaranjem abdomena životinja i obostranom ekstrakcijom žlezda.

3.5. Biohemijske analize

3.5.1. Određivanje koncentracije kortikosterona u serumu

Koncentracije kortikosterona u serumu su određene pomoću komercijalnog ELISA kompleta po uputstvu proizvođača (IDS LTD, UK) Kao standard korišćen je pacovski kortikosteron. Absorbance su merene na 560 nm, a vrednosti koncentracije su izražene u ng/ml.

3.5.2. Određivanje koncentracije glukoze u serumu

Koncentracije glukoze u serumu su određene pomoću Randox Lab GOD/PAP (4-aminofenazon, oksidaza glukoze, peroksidaza) kompleta, uz korišćenje pacovske glukoze kao standarda (INEP, Beograd, Srbija). Absorbance su merene na 500nm a vrednosti koncentracije su izražene u mmol/L. Referentne vrednosti glukoze u serumu ili plazmi pacova su 4.2–6.4 mmol/L (Uysal i saradnici, 2005).

3.6. Određivanje težine nadbubrežne žlezde

Nadbubrežne žlezde su merene odmah po izolaciji. Izračunata je vrednost relativne težine \pm standardna greška nadbubrežnih žlezda za obe grupe životinja (AL i DR). Dobijene srednje težine nadbubrežnih žlezda izražene kao procentualno učešće težine ove žlezde u ukupnoj težini tela životinje.

3.7. Izolacija RNK i reverzna transkripcija (RT)

Ukupna RNK je izolovana iz 100 mg tkiva ipsilateralne kore prednjeg mozga svih eksperimentalnih grupa TRIZOL reagensom (GIBCO BRL, Life Technologies), prema protokolu proizvođača. Koncentracija RNK je određena spektrofotometrijski, a intaktnost izolovane RNK proverena na 1% agaroznom gelu. Moguća kontaminacija uzoraka hromozomskom DNK otklonjena je tretmanom 10 μ g ukupne RNK sa 10 U RNase free DNase I (Fermentas) tokom 30 minuta na 37°C. DNaza I je inaktivirana dodavanjem EDTA i inkubacijom 10 minuta na 65°C, a potom otklonjena u postupku fenol-hloroformske ekstrakcije nukleinskih kiselina (fenol:hloroform=3:1). Prečišćena RNK je rastvorena u vodi tretiranoj 0,1% dietilpirokarbonatom (DEPC). Za reverznu transkripciju tj. sintezu cDNK je korišćen komplet High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) sa nasumičnim heksamerima, po sledećem protokolu: 10 minuta na 25°C, 30 minuta na 48°C i 5 minuta na 95°C. Reakciona smeša u zapremini od 50 μ l je sadržavala: 1x RT pufer, 5,5 mM MgCl₂, 0,5 mM svakog nukleotida, 2,5 μ M amplimera, 0,4 U/ μ l RNaznog inhibitora, 1,25 U/ μ l MultiScribe reverzne transkriptaze i 100 ng RNK.

Sekvence prajmera i uslovi u kojima su PCR reakcije rađene su prikazani u Tabeli 1. Sekvence su preuzete iz sledećih referenci: za Bcl-2 (Ge i saradnici, 2004) i za Bcl-xL (Bar-Am i saradnici, 2005). U obe reakcije su kao kontrola korišćeni prajmeri specifični za gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) (Wong i saradnici, 1994). U svakoj reakciji

je korišćeno 200 ng cDNK. U svim reakcijama koncentracija MgCl₂ je finalno bila 2 mM, a kada je u pitanju dNTP komponenta 0,2 mM. Sve PCR reakcije su rađene iz dve nezavisne RT reakcije najmanje po tri puta iz svake.

Tabela 1. Sekvence i uslovi rada prajmera korišćenih u semikvantitativnoj RT-PCR analizi.

| Gen | Sekvence prajmera (5'-3') | Dužina (bp) | PCR profil T°C trajanje | Broj ciklusa |
|---------------|---------------------------|-------------|-------------------------------|--------------|
| <i>bcl-2</i> | GGAGATCGTGATGAAGTA | 499 | 94°C 15 s | 28 |
| | TCAGGTACTCAGTCATCC | | 56°C 30 s 72°C 30 s | |
| <i>bcl-xL</i> | GTAAACTGGGGTTCGCATTGT | 198 | 94°C 15 s | 26 |
| | TGCTGCATTGTCCCATAGA | | 56°C 30 s 72°C 30 s | |
| <i>gapdh</i> | CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT | 306 | u zavisnosti od ciljnog gena | |
| | AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC | | | |

3.7.1. Analiza i kvantifikacija PCR produkata

PCR produkti (dužine su date Tabeli 1) su analizirani na 2% agaroznom u 1xTBE puferu (1xTris/Borate/EDTA pufer: 89 mM Tris, 89 mM Borna kiselina, 2 mM EDTA) uz dodatak 4 µL etidijum bromida (10 mg/mL) Nakon elektroforeze u 1X TBE puferu produkti su vizuelizovani na Gel Doc sistemu (Gel Doc 1000, Bio Rad) a signal je kvantifikovan korišćenjem Multi-Analyst/PC Software Image Analysis System (Bio Rad). Dobijene vrednosti signala za određeni gen u svakom uzorku su izražene u odnosu na vrednost signala endogene kontrole istog uzorka. Tako dobijene relativne vrednosti su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje.

3.7.2. Kvantitativni RT-PCR u realnom vremenu (Q-PCR)

Analiza promena na nivou iRNK urađena je metodom kvantitativnog RT-PCR u realnom vremenu (*engl.* Quantitative Polymerase Chain Reaction, Q-PCR). Slično ostalim RT-PCR pristupima, metoda obuhvata najpre korak reverzne transkripcije u kome se ukupna iRNK prevodi u cDNK, a potom korak amplifikacije dela cDNK od interesa. Kod RT-PCR-a u realnom vremenu u svakom ciklusu PCR-a se prati zastupljenost sintetisanog produkta što omogućava pouzdanu kvantifikaciju nivoa ekspresije ispitivanog gena.

Da bi se odredili optimalni uslovi RQ-PCR reakcije potrebni za pouzdanu kvantifikaciju, kao i odgovarajuća endogena kontrola za svaki ispitivani gen, detaljno su ispitani i upoređeni nivoi ekspresije i efikasnost amplifikacija 5 najčešće korišćenih endogenih kontrola: β -aktina, gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaze (gapdh), hipoksantina (hprt), 18S rRNK i ciklofilina B (cyp B) kao što je to opisano u radu Tanića i saradnika (2007). Analiza je pokazala da se u našim eksperimentalnim uslovima kao odgovarajuće endogene kontrole mogu koristiti gapdh (raspon promene - 1 ciklus) i β -aktin (raspon promene - 1,2 ciklusa). Dalja provera efikasnosti amplifikacije za ciljne gene i odgovarajuće endogene kontrole urađena je sa serijskim razblaženjima cDNK (0,01, 0,1, 1, 10 i 100 ng RNK prevedene u cDNK).

Nakon izbora odgovarajuće endogene kontrole urađene su TaqMan RQ-PCR reakcije za ciljne gene (Tabela 2). U analizi su korišćeni komercijalni eseji (Assay-on-Demand Gene Expression Product, Applied Biosystems) prikazani u Tabeli 2. Reakciona smeša je sadžala 1xTaqMan® Universal Master Mix sa AmpErase® Uracil N-glikozilazom (UNG), 1x Assay Mix FAM-MGB probe (*engl.* Minor groove binder probe obeležene 6-FAM bojom) i 1ng RNK prevedene u cDNK. Za reakcije lančane polimerizacije je korišćen aparat ABI Prism 7000 Sequence Detection System i sledeći program amplifikacije: 2 minuta na 50°C, 10 minuta na 95°C i 40 ciklusa po 15 sekundi na 95°C i 1 minut na 60°C. Svaki uzorak je testiran u triplicatu, a srednja Ct vrednost je korišćena za dalju analizu. Zarad korekcije internih razlika u efikasnosti amplifikacije svaki uzorak je normalizovan u odnosu na nivo ekspresije odgovarajuće endogene kontrole. Kvantifikacija je urađena 2- $\Delta\Delta$ Ct metodom (Livak i Schmittgen, 2001), a dobijeni rezultati testirani na statističku značajnost ($p \leq 0.05$) koristeći softverski paket RQ Study Add ON v 1.1. Da bi se utvrdili efekti dijete za sve ispitivane gene kao kalibrator je korišćen uzorak fiziološka

kontrola. Rezultati su izraženi kao stepen promene u odnosu na kontrolnu grupu kojoj je dodeljena vrednost 1 (srednja vrednost \pm standardna greška).

Tabela 2. Identifikacioni brojevi eseja korišćenih u RQ-PCR analizi.

| Gen | Identifikacioni broj |
|---------------------------------|-----------------------------|
| <i>gap-43</i> | Rn00567901_m1 |
| <i>sinaptophysin</i> | Rn00561986_m1 |
| <i>β-aktin</i> | Rn00667869_m1 |
| 18s RNK | Hs99999901_s1 |
| <i>cypB</i> | Rn00574762_m1 |
| <i>hprt</i> | Rn01527838_g1 |
| <i>gapdh</i> | Rn99999916_s1 |

3.6. Određivanje količine proteina semikvantitativnom analizom imunoblotova

3.6.1. Izolovanje proteina

Proteini su izolovani iz 100 mg tkiva ipsilateralne kore prednjeg mozga svih eksperimentalnih grupa. Tkivo je sonifikovano u 10 volumena RIPA pufera (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 0,5% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1mM EGTA) u koji je na 10 ml dodata po jedna tableta koktela proteaznih inhibitora (Mini Protease Inhibitors Coctail, Boehringer M). Nakon 30 minuta inkubacije na ledu lizati su centrifugirani (30 minuta na 14 000 x g na 4°C). Supernatanti su odliveni i do dalje analize čuvani na -80°C.

3.8.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija ukupnih proteina određena je mikrometodom pomoću kompleta *Micro BCA™ Protein Assay Kit* (Pierce Perbio Science Company) prema uputstvu proizvođača. U 150 μ l dejonizovane vode dodato je 10 μ l uzorka i 40 μ l koncentrovane boje i nakon 120 minuta inkubacije na 37°C očitana je apsorbancija na 562 nm na "ELISA" čitaču (Bio-Rad Laboratories). Koncentracija uzoraka određena je iz standardne krive dobijene upotrebom poznatih koncentracija proteina goveđeg serum albumina (*engl.*, Bovine Serum Albumin – BSA; Sigma).

3.8.3. Elektroforeza proteina

Elektroforetsko razdvajanje proteina prema molekularnoj težini vršeno je na SDS denaturišućim poliakrilamidnim gelovima - SDS-PAGE (*engl.* sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS). Korišćena je mini aparatura za elektroforezu (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories). Gel za razdvajanje je pored akrilamid/bisakrilamida (Sigma) u odnosu 29:1, čija je finalna koncentracija u smesi iznosila po potrebi: 7, 10 ili 12 %, sadržavao i 0,375 M Tris pH 8,8 i 0,1% SDS. Gel za koncentrisanje bio je sledećeg sastava: 5% akrilamid/bisakrilamid (29:1); 0,125 M Tris pH 6,8 i 0,1% SDS. Za polimerizaciju je korišćeno 60 μ l 10% amonijum persulfata (ICN) i 5 μ l TEMED-a (Serva) na 10 ml smese, za oba gela.

Količina proteina koja je nanošena na gel optimizovana je eksperimentalno za svaki protein, na osnovu kriva konstruisanih sa serijskim razblaženjem proteina i u prisustvu primarnog antitela u koncentraciji preporučenoj od proizvođača. Kao optimalna količina proteina uzeta je ona koja se nalazi u linearnom opsegu krive zavisnosti intenziteta signala i količine nanetih proteina. Uzorci proteina su pre nanošenja na gel pomešani sa 2 x Laemmli pufer-om (31,25 mM Tris pH 6,8; 10% glicerol; 1% SDS; 5% 2-merkaptotanol; 0,025% bromfenol plavo) u odnosu 1:1 (v/v) i. denaturisani kuvanjem 5 minuta na 95°C. Kao standard za molekularnu težinu korišćen je obojeni "Rainbow" marker širokog opesega (Amersham). Elektroforeza je vršena u puferu za elektroforezu (192 mM glicin; 25 mM Tris pH 8,3; 0,1% SDS) pod konstantnim naponom od 120 V na sobnoj temperaturi.

3.8.4. Prenos proteina sa SDS-poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu i imunološka detekcija imobilizovanih proteina (Western blotting)

Prenos proteina sa poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu (Amersham Hybond-C) je rađen korišćenjem sistema za transfer (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories). Nakon završene elektroforeze gel za razdvajanje je inkubiran 15 minuta u puferu za transfer (20% metanol; 192 mM glicin; 25 mM Tris pH 8,3). Nitrocelulozna membrana je ekvilibrisana u destilovanoj vodi 10 minuta, a zatim 20 minuta u puferu za transfer. Elektrotransfer proteina je vršen tokom 60 minuta, pod konstantnim naponom od 120 V na sobnoj temperaturi. Po završenom transferu membrane su obojene Ponceau S bojom (1% Ponceau S boja; 5% glacijalna sirćetna kiselina; destilovana voda) radi vizuelizacije proteinskih traka i potvrde uspešnosti transfera.

Imunološka detekcija imobilizovanih proteina rađena je na nitroceluloznim membranama prethodno nakvašenim 15 minuta u destilovanoj vodi, a zatim 20 minuta u Tris puferu sa dodatkom Tween-20 deterđenta (TBS-T: 20 mM Tris-HCl pH 7,6; 137 mM NaCl; 0.05% Tween 20). Membrane su zatim inkubirane u 5% rastvoru mleka (Blotto, Non-Fat Dry Milk, Santa Cruz) u TBS-T puferu, u cilju blokiranja nespecifičnog vezivanja antitela. Potom su ispirane u TBS-T puferu 10 minuta, i inkubirane sa primarnim antitelima u rastvoru za blokiranje. Korišćena su sledeća primarna poliklonska antitela (razblaženje v/v): zečje anti-sinaptofizin (1:10000, ICN); zečje anti-GAP-43 (1:4000, Chemicon); zečje anti-GFAP (1:8000 Dako); kozje anti-neurokan (1:500, Santa Cruz), zečje anti-TNF α (1:1000, Santa Cruz), koje obeležava solubilni TNF α protein (17 kDa); zečje anti-kaspaza-3 (Asp175-) (1:500, Cell Signalling), koje obeležava sećeni fragment od 17 kDa ; zečje anti-GR (P-20) (1:250, Santa Cruz), koje obeležava ukupni GR receptor; zečje anti-phospho GR (Ser211) (1:500, Cell Signalling), koji obeležava GR receptor fosforilisan na serinu 211; kozje anti-11 β -HSD1 (1:1000, R&D Biosystems); zečje anti-NF κ B (p65) (1:15000, Santa Cruz), koje obeležava p65 subjedinicu NF κ B transkripcionog faktora; zečje anti- β -aktin (1:10000, Sigma); kao i monoklonsko mišje anti- β -tubulin (1:8000, ICN).

Nakon inkubiranja sa primarnim antitelom membrane su ispirane 3 puta po 10 minuta u TBS-T puferu, a potom inkubirane 60 minuta na sobnoj temperaturi u TBS-T puferu sa odgovarajućim sekundarnim antitelom obeleženim enzimom peroksidazom rena (*engl.* Horse Radish Peroxidase, HRP) i to: anti-zečje antitelo (1:2000, Santa Cruz), anti-mišje antitelo (1:1000, ICN) i anti-kozje antitelo (1:5000, Dako).

Nakon ispiranja 3 puta po 10 minuta u TBST-u, membrane su izložene dejstvu luminola (komercijalni komplet za hemiluminescenciju - RNP 2106 Western blotting detection reagents, Amersham). Membrane su inkubirane u luminolu 2 minuta, ocedene i izložene autoradiografskom filmu osetljivom na plavu svetlost u trajanju od 1 do 30 minuta, u zavisnosti od korišćenog antitela. Filmovi su razvijeni i skenirani radi dalje analize dobijenih signala.

3.8.5. Semikvantitativna analiza imunoblotova

Intenzitet dobijenih signala kvantifikovan je denzitometrijski, korišćenjem kompjuterskog programa za analizu signala (ImageQuant 5.2). Vrednosti dobijene za ciljne proteine su normalizovane u odnosu na β -aktin, odnosno β -tubulin, kao kontrolu za

nanetu količinu totalnih proteina. Tako dobijene relativne vrednosti su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje.

3.9. Histološke analize

3.9.1. Priprema tkiva za histološku analizu

Životinje su žrtvovane u odgovarajućim vremenskim tačkama (kontrola, 2, 7, 14. i 28. dan) nakon lezije (n=3 po grupi). Mozgovi su izolovani, fiksirani u 4%-tnom rastvoru paraformaldehida u 0,1M PBS-u pH 7,4 u trajanju od 24 sata na 4°C. Tkivo je potom dehidratirano kroz seriju rastvora sa rastućim koncentracijama saharoze (10%, 20%, 30%) u PBS-u tokom 72 sata na 4°C. Potom su mozgovi su zamrznuti u izopentanolu i čuvani na -80°C do daljeg korišćenja. Mozgovi su isečeni na kriotomu (Leica) na preseke debljine 18 µm, a za dalju analizu uziman je svaki peti koronalni presek. Preseci su lepljeni direktno na mikroskopske pločice. Pločice sa presecima su radi fiksacije ostavljane 24 sata na sobnoj temperaturi i nakon toga čuvane na -20°C, do daljeg korišćenja.

3.9.2. Imunohistohemijsko obeležavanje

Za obeležavanje bojama u vidljivom delu svetlosnog spektra, tj. za svetlosnu mikroskopiju korišćen je senzitivn LSAB komplet (Dako). Kao hromogen korišćen je 3, 3, diaminobenzidin tetrahlorid (DAB) koji, nakon razlaganja enzimom peroksidazom rena, razvija specifičnu braon boju. Za fluorescentnu mikroskopiju korišćene su postojeane Aleksa fluorescentne boje (Invitrogen).

Čitav postupak, osim inkubacije u primarnom antitelu, urađen je na sobnoj temperaturi, a rastvori su pravljani u 0,1 M fosfatnom puferu, pH 7,4. Pločice sa presecima pripremanim za svetlosnu mikroskopiju su najpre inkubirane 5 minuta u smeši 3% vodonik-peroksida i 10% metanola kako bi se blokirala aktivnost endogene preoksidaze. Nakon ispiranja 3 puta po 5 minuta u fosfatnom puferu, inkubiranjem preseka jedan sat u 5% serumu kože (Dako), blokirana su mesta za nespecifično vezivanja antitela. Na ovako pripremljene preseke nakapan je rastvor primarnog antitela u fosfatnom puferu koji je sadržao 3% serum kože i 0.1% deterdžent Triton X-100 (BDH Chemicals) i inkubirani preko noći na 4°C. Korišćena su sledeća primarna antitela (razblaženje v/v); zečje anti-sinaptofizin (1:2000, ICN); zečje anti-GAP-43 (1:1000, Chemicon); zečje anti-GFAP

(1:2000, Dako); kozje anti-Iba-1 (1:500, Abcam). Nevezana primarna antitela uklonjena su ispiranjem u fosfatnom puferu 3 puta po 5 minuta. Zatim su preseći inkubirani 30 minuta sa biotiniziranim sekundarnim antitelom LSAB kompleta (Dako) za koje je vezan streptavidin/biotin kompleks. Pločice sa presecima su potom isprane u fosfatnom puferu. Za vizuelizaciju imunokompleksa, kao supstrat peroksidazi rena, ponuđen je DAB (DAB/metal concentrate, Boeringer M) 10 puta razblažen u peroksidaznom puferu (Peroxide Buffer, Boeringer M). Reakcija je prekidana ispiranjem pločica sa presecima u tekućoj, a zatim u destilovnoj vodi. Pločice su dalje standardno pripremljene za mikroskopiranje, provlačenjem kroz seriju etil-alkohola (po 5 min 70%, 95%, 100% etanol, 2x5min ksilol) i nakapavanjem medijuma za mikroskopiranje (Fisher Scientific).

Fluorescentno obeležavanje rađeno je po sličnom protokolu kao i obeležavanje preseka za bojenje DAB-om. Izbačen je samo korak blokiranja endogene peroksidaze, a kao sekundarno antitelo korišćeno je antitelo obeleženo fluorescentnom bojom. Preseci su obeleženi kozjim anti-neurokan (1:100, Santa Cruz) antitelom i odgovarajućim sekundarnim antitelom za koje je bila vezana Aleksa Fluor-568 boja (crveno) (1:500, Invitrogen). Odgovarajuća negativna kontrola (bez primarnog antitela) ukazala je na odsustvo nespecifičnog vezivanja. Preseci su analizirani na mikroskopu Axio Observer Microscope Z1, ZEISS.

3.9.2.1. Kvantifikacija Iba-1-pozitivnih ćelija

Morfološke karakteristike mikroglijskih ćelija ocenjivane su pomoću trostepene skale. Definisana su tri profila mikroglijskih ćelija na osnovu dužine i debljine njihovih nastavaka i karakteristika ćelijskog tela (Tabela 3). Svakom morfološkom profilu mikroglijskih ćelija odgovara određeni stepen aktivacije. Reprezentativni primeri svakog ćelijskog tipa prikazani su na Slici 10.

Tabela 3. Skala kategorizacije Iba-1-pozitivnih mikroglijskih ćelija

| Stupanj aktivacije | Morfološki kriterijumi |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Mirujuća mikroglija</i> (Slika 9 a i f) | Ramifikovane ćelije sa tankim nastavcima |
| <i>Umereno aktivirana mikroglija</i> (Slika 9 c i d) | Mikroglijske ćelije sa skraćenim i zadebljalim nastavcima |
| <i>Intenzivno aktivirana mikroglija</i> (Slika 9 b) | Mikroglijske ćelije hipertrofiranih ćelijskih tela i prikupljenih nastavaka sa ameboidnom ili okruglom morfologijom |

Za potrebe brojanja mikroglijskih ćelija korišćena su po tri koronalna preseka debljine 18 μ m iz mozga svake životinje načinjena u nivou lezije (n=3 životinje za svaku vremensku tačku AL i DR grupe). Razmak između dva analizirana preseka iz istog mozga iznosio je 90 μ m. U okviru svakog preseka analizirana su po tri polja dimenzija 200 μ m x 200 μ m (po jedno polje sa svake strane i jedno ispod same lezije). Iba-1-pozitivne mikroglijske ćelije u sva tri aktivaciona stanja (mirujuće, umereno i intenzivno aktivirane) brojane su u svakom polju svakog preseka, a vrednosti su zatim statistički obrađene.

3.9.3. Histološka bojenja

3.9.3.1 Fluoro-Žad B i Hoëchst 33528 bojenje

Fluoro-Žad B boja (Chemicon) je korišćena za detekciju neurona u procesu degeneracije po protokolu koji su uspostavili (Schmued i Hopkins, 2000a, b), dok je Hoechst 33258 boja korišćena za analizu stanja hromatina. Pločice sa presecima su uranjene redom u: 1% rastvor natrijum hidroksida u 80% etanolu (5 minuta), 70% etanol (2 minuta), destilovanu vodu (2 minuta), 0,06% rastvor kalijum permanganata (10 minuta). Zatim su ispirane u destilovanoj vodi (2 minuta) i prebačene u rastvor Fluoro-Žad boje. Radni rastvor boje (0,0004%) je napravljen dodavanjem 4 ml koncentrovanog rastvora (0,01% rastvor boje u destilovanoj vodi) u 96 ml 0,1% rastvora sirćetne kiseline. Posle 20

minuta bojenja pločice su ispirane 3 puta po 1 minut u destilovanoj vodi, a zatim uronjene u 0,01% rastvor Hoechst 33258 boje u vodi (Acros Organics, SAD) 10 minuta. Posle ispiranja (3 puta po 1 minut u destilovanoj vodi) i sušenja na sobnoj temperaturi, pločice su uronjene u ksilol (3 minuta) radi putpune dehidracije i na preseke je nanet glicerol i stavljeno pokrovno staklo. Kao negativna kontrola koristile su pločice sa presecima koje su prošle isti postupak osim što nisu izlagane dejstvu Fluoro-Žad B i Hoechst boje već 0,1% rastvoru sirćetne kiseline. Preseci su analizirani na mikroskopu Axio Observer Microscope Z1, ZEISS sa odgovarajućim filterima (zeleni i plavi). Neuroni u procesu degeneracije koje obeleži Fluoro-Žad B boja se jasno razlikuju od pozadine jer se vide kao zasebne fluorescentno zelene tačke u odnosu na crnu pozadinu. Broj Fluoro-Žad B-pozitivnih neurona čija su jedra sadržala izrazito kondenzovan hromatin brojan je u 3 vidna polja oko mesta lezije na uveličanju 20x (0,38 mm²) u 5 preseka po životinji (n=3 životinje za svaku vremensku tačku AL i DR grupe).

3.10. Statistička obrada podataka

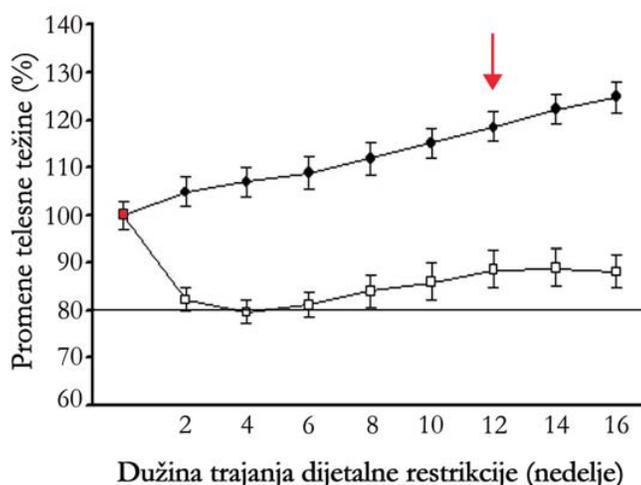
Relativne promene u ekspresiji iRNK i proteina su predstavljene u procentima (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na kontrolnu vrednost kojoj je dodeljena vrednost od 100%. Za statističku analizu dobijenih relativnih vrednosti je korišćen softverski paket STATISTICA 6.0. Nakon provere da li podaci podležu normalnoj distribuciji usledila je dalja ststistička analiza. Komparacija između grupa koje su pokazale normalnu distribuciju je rađena korišćenjem jednofaktorske ANOVA analize prosleđene LSD testom. Podaci koji ne podležu normalnoj raspodeli analizirani su Kruskal-Wallis ANOVA analizom i nakon toga U-testom. Za statističku analizu broja mikrogljjskih ćelija, kao i težine nadbubrežnih žlezda životinja, korišćen je Studentov t-test. Statistički značajnim razlikama su smatrane one kod kojih je $p \leq 0,05$ i na graficima i u tabelama su obeležene simbolom *, # i \$.

4. Rezultati

4.1 Uticaj dijetalne restrikcije na telesnu težinu, težinu nadbubrežne žlezde, nivo glukoze i kortikosterona u serumu životinja

4.1.1. Uticaj dijetalne restrikcije na telesnu težinu životinja

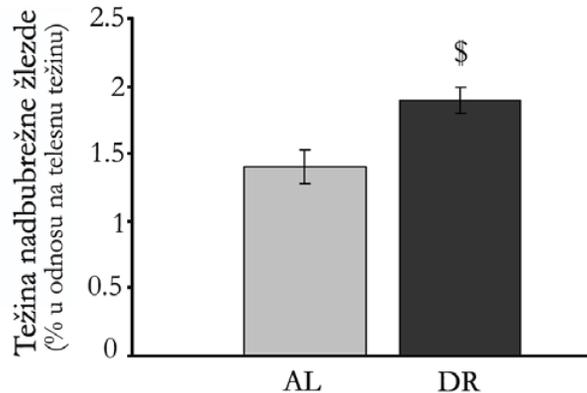
Životinje podvrgnute dijetalnoj restrikciji su izgubile oko 20% svoje početne telesne težine tokom prve 4 nedelje restriktivnog režima ishrane, a zatim su počele da dobijaju na težini od 6. do 12. nedelje eksperimenta. Posle toga, njihove težine se nisu menjale, održavajući se na oko 90% težine sa početka eksperimenta. Životinje iz AL grupe su do kraja eksperimenta težile u proseku oko 25% više nego na početku eksperimenta. U vreme operacije životinje iz DR grupe težile su u proseku oko 30% manje od AL životinja (Slika 5).



Slika 5. Telesne težine AL i DR životinja u toku eksperimenta. Rezultati su izraženi kao procenat (%) promene (srednja vrednost \pm greška) u odnosu na početnu telesnu težinu (100%); ◆ AL; □ DR; crvena strelica označava vreme operacije.

4.1.2. Uticaj dijetalne restrikcije na težinu nadbubrežne žlezde pacova

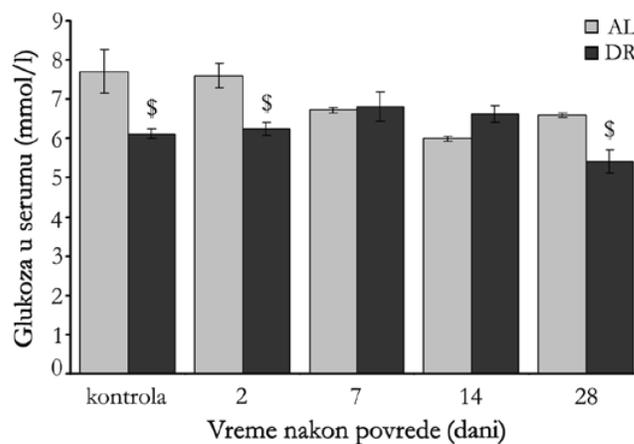
Merene su težine nadbubrežnih žlezda kontrolnih AL i DR životinja i analizirano procentualno učešće njihove težine u ukupnoj težini tela pacova. Dobijeni podaci, statistički obrađeni t-testom, otkrili su značajan porast težine tkiva nadbubrega u odnosu na ukupnu težinu tela DR životinja u odnosu na AL životinje (Slika 6; $\$p < 0.05$).



Slika 6. Težina nadbubrežne žlezde AL i DR životinja. Grafički prikaz odnosa udela težine nadbubrežne žlezde u ukupnoj telesnoj težini AL i DR životinja (srednja vrednost \pm standardna greška; izraženo u % u odnosu na težinu tela životinja); \$p<0,05 u odnosu na AL.

4.1.3. Uticaj dijetalne restrikcije na nivo glukoze u serumu životinja

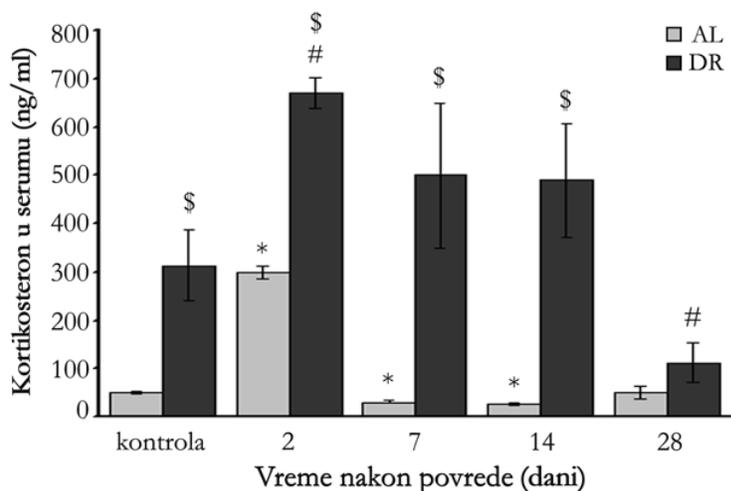
Statističkom obradom podataka dobijenih merenjem koncentracija glukoze nisu otkrivene značajne promene u serumu AL i DR životinja ni u jednoj vremenskoj tački u poređenju sa životinjama iz odgovarajućih kontrolnih grupa (Slika 7). Dvofaktorska ANOVA je pokazala značajan efekat dijetalne restrikcije na koncentraciju glukoze u serumu ($F(1,48)=27,704$, $p<0.05$). *Post hoc* analizom je utvrđen značajan pad nivoa glukoze u serumu DR životinja u odnosu na AL životinje u kontrolnoj grupi životinja (21%), u 2. danu (16%) i u 28. danu (19%) nakon povrede (\$p<0.05).



Slika 7. Koncentracije glukoze u serumu kod AL i DR životinja. \$p<0,05 u odnosu na odgovarajuću vremensku tačku za AL.

4.1.4. Uticaj dijetalne restrikcije na nivo kortikosterona u serumu životinja

Koncentracije serumskog kortikosterona merene su kod obe grupe životinja (AL i DR) u svim vremenskim tačkama od 2. do 28. dana nakon povrede, kao i u fiziološkim kontrolama obe grupe (Slika 8). Dvofaktorska ANOVA pokazala je značajan efekat faktora dijetalne restrikcije ($F(6,32)=7,65$; $p<0.05$), vremena ($F(1,32)=48,82$; $p<0.05$), kao i interakcije faktora restrikcija i vreme ($F(6,32)=4,91$; $p<0.05$). U AL grupi, došlo je do porasta serumskog kortikosterona (6 puta) u 2. danu, zatim do pada u 7. (64%) i 14. (52%) danu i povratka na kontrolni nivo do 28. dana nakon povrede u odnosu na odgovarajuću AL kontrolu ($*p<0.05$). U DR grupi nivo kortikosterona bio je značajno povišen (2 puta) u 2. danu nakon povrede, a značajno snižen (63%) u 28. danu nakon povrede u poređenju sa odgovarajućom DR kontrolom ($\#p<0.05$), dok u ostalim vremenskim tačkama oporavka nije uočena značajna promena. *Post hoc* analiza je pokazala da je nivo kortikosterona u serumu DR životinja bio značajno povišen u poređenju sa AL životinjama u svim vremenskim tačkama ($\$p<0.05$). Takođe, kontrolne DR životinje su imale preko pet puta višu koncentraciju kortikosterona u serumu od AL kontrolnih životinja.

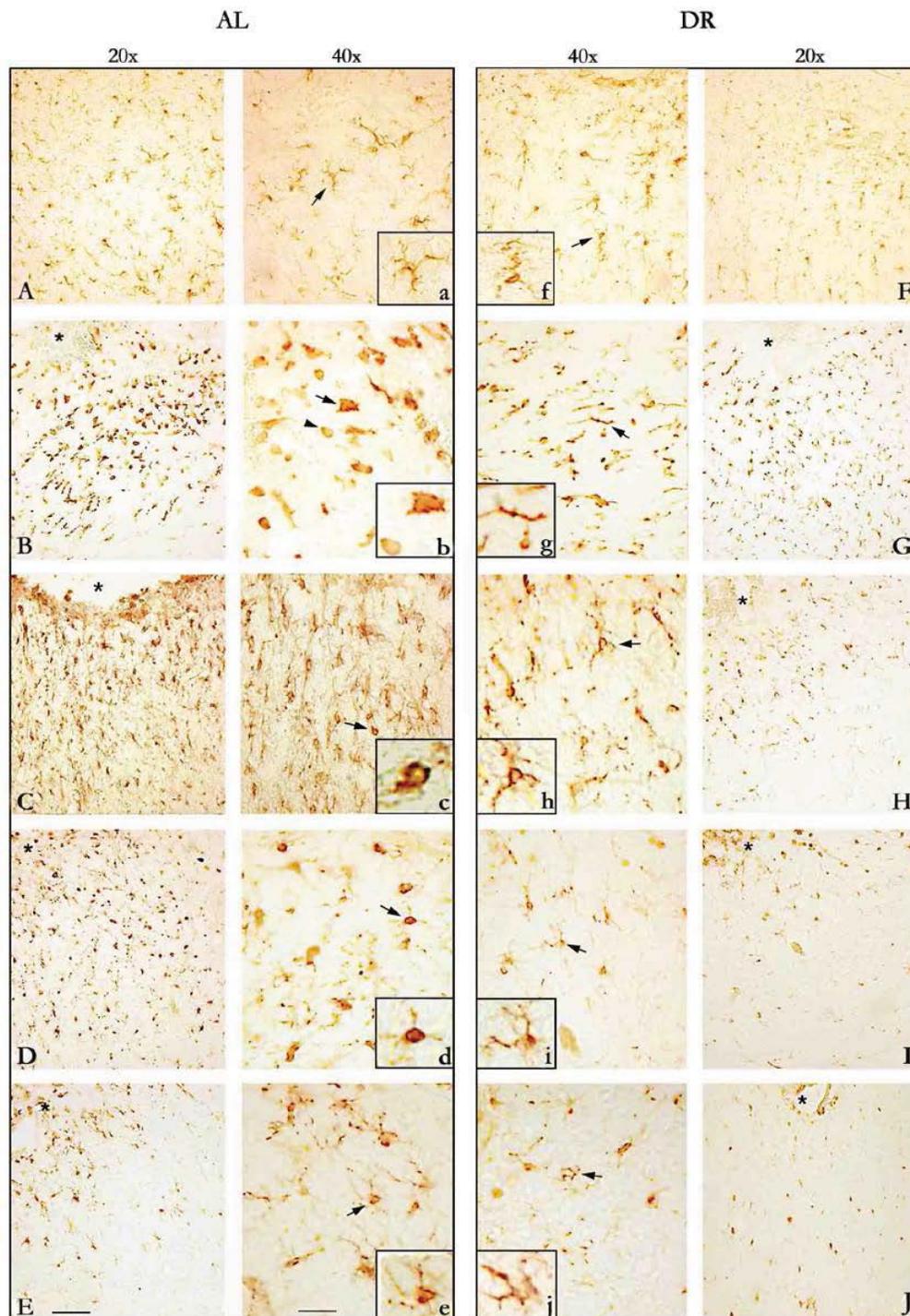


Slika 8. Koncentracija kortikosterona u serumu AL i DR životinja. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna greška u odnosu na vrednosti za kontrolu. $*p<0,05$ u odnosu na AL kontrolu; $\#p<0,05$ u odnosu na DR kontrolu; $\$p<0,05$ u odnosu na odgovarajuću vremensku tačku za AL.

4.2 Uticaj dijetalne restrikcije na procese inflamacije u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede

4.2.1. Uticaj dijetalne restrikcije na aktivaciju mikroglije

Jedno od glavnih obeležja sekundarne povrede mozga jeste aktivacija mikroglijskih ćelija, koja se ogleda u promeni morfologije ovih ćelija. Specifičan marker mikroglijskih ćelija, protein Iba-1 korišćen je za morfološku karakterizaciju ovih ćelija u regionu oko samog mesta lezije kod AL i DR životinja (Slika 9). Imunohistohemijska analiza je pokazala veliki broj Iba-1 pozitivnih ćelija kako kod AL, tako i kod DR životinja tokom čitavog perioda oporavka. Najveći broj mikroglijskih ćelija kod AL životinja imao je morfologiju karakterističnu za aktiviranu mikrogliju (Slika 9 B-E). Kod DR životinja mikroglijske ćelije oko mesta povrede zadržale su uglavnom morfologiju karakterističnu za mirujuću mikrogliju tokom čitavog vremena oporavka nakon povrede (Slika 9 G-J). Najizraženije razlike u morfologiji mikroglijskih ćelija između AL i DR životinja su zapažene 2. dana nakon povrede. U toj vremenskoj tački je kod AL životinja, oko mesta povrede, uočen veliki broj mikroglijskih ćelija koje su imale krupna ćelijska tela ameboidnog ili okruglog oblika bez vidljivih nastavaka, što morfološki odgovara krajnjim stepenima aktivacije mikroglije (Slika 9B, b). Za razliku od toga, većina mikroglijskih ćelija oko mesta povrede kod DR životinja imala je mala ćelijska tela i duge razgranate nastavke, tj. morfologiju karakterističnu za mirujuću mikrogliju (Slika 9G, g). U odgovarajućem regionu kore mozga AL i DR kontrolnih životinja (senzomotorni deo), sve mikroglijske ćelije imale su morfologiju mirujuće mikroglije (Slika 9 A, a i F, f).



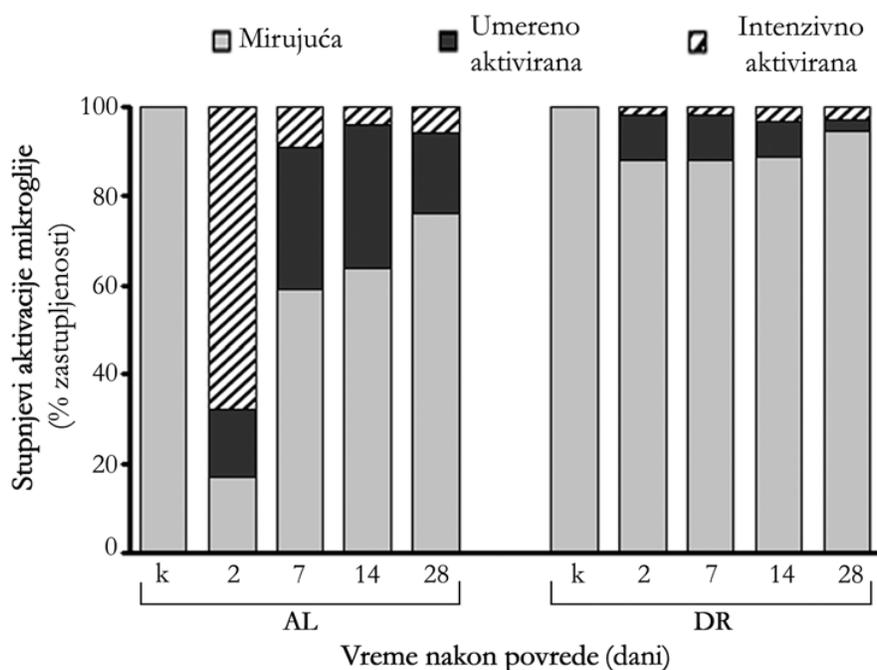
Slika 9. Uticaj dijetalne restrikcije na morfologiju mikroglijskih ćelija. Iba-1 imunohistohemijsko obeležavanje mikroglijskih ćelija u neposrednoj blizini mesta povrede; Skale 50 μ m i 20 μ m za uveličanje 20x i 40x. Reprezentativni preseći mozga AL (A-E) i DR (F-J) životinja. Strelice označavaju ćelije uveličane u okvirima (a-h); * - mesto povrede.

Kako bi se utvrdio nivo aktivacije mikroglije, izračunat je broj Iba-1 pozitivnih ćelija za svaki stepen aktivacije pomoću skale za kategorizaciju morfološkog stanja mikroglijskih ćelija (opisano u poglavlju *Materijal i metode*; Tabela 3). Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 4. Okarakterisana su tri ćelijska profila mikroglijskih ćelija prema dužini i debljini njihovih nastavaka, kao i prema izgledu njihovih ćelijskih tela (*mirujuća*, *umereno aktivirana* i *intenzivno aktivirana mikroglija*). Ukupan broj mikroglijskih ćelija oko mesta povrede bio je značajno povećan i u AL (*p<0,05) i u DR (, #p<0,05) grupi životinja nakon povrede, u poređenju sa odgovarajućim kontrolama za obe grupe. U AL grupi životinja aktivirana mikroglija je bila prisutna tokom čitavog perioda oporavka, pri čemu je najveći broj *intenzivno aktiviranih* mikroglijskih ćelija uočen 2. dana nakon povrede. Broj *mirujuće* mikroglije u ovoj vremenskoj tački bio je značajno snižen u poređenju sa odgovarajućom AL kontrolom (*p<0,05). Kod DR životinja najveći broj mikroglijskih ćelija koje su uočene oko mesta povrede zadržao je morfologiju karakterističnu za mirujuću mikrogliju. Samo je mali broj aktiviranih mikroglijskih ćelija uočen kod DR životinja u 2. danu nakon povrede, ali je stepen aktivacije ovih ćelija bio daleko niži od aktivirane mikroglije u mozgu AL životinja oko mesta povrede. Istovremeno, kod DR životinja je u 2. danu nakon povrede uočen značajan porast broja *mirujuće mikroglije* u odnosu na kontrolnu DR grupu (#p<0,05). U ostalim vremenskim tačkama, uočeno je značajno povećanje broja *umereno aktivirane mikroglije* kod AL u odnosu na DR životinje i to u 7, 14. i 28. danu nakon povrede (\$p<0,05). Broj *intenzivno aktivirane mikroglije* bio je značajno povećan kod AL u odnosu na DR životinje u 2. i 7. danu nakon povrede (\$p<0,05). Važno je naglasiti da je u okviru same AL grupe daleko najveći broj *intenzivno aktivirane mikroglije* uočen u 2. danu nakon povrede (&p<0,05), da bi njihov broj značajno opao u kasnijim vremenskim tačkama. Imunohistohemijskom analizom nisu uočene razlike u broju i morfologiji mikroglijskih ćelija u mozgu kontrolnih AL i DR životinja.

Tabela 4. Broj Iba-1 – pozitivnih ćelija oko mesta lezije kod AL i DR životinja nakon povrede. Klasifikacija mikrogljijskih ćelija izvršena je prema morfološkim karakteristikama (Slika 10, Tabela 3). Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm greška. * $p < 0.05$ u odnosu na AL kontrolu; # $p < 0.05$ u odnosu na DR kontrolu; \$ $p < 0.05$ u odnosu na DR; & $p < 0.05$ u odnosu na ostale vremenske tačke u okviru AL grupe.

| | | kontrola | 2. dan | 7. dan | 14. dan | 28. dan |
|--------------------------------------------------------|----|--------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| Mirujuća mikroglija (Slika 9 a,f) | AL | 9.87 \pm 0.81 * | 4.44 \pm 0.93 * | 16.67 \pm 1.12 * | 22.11 \pm 1.05 * | 11.78 \pm 0.60 * |
| | DR | 10.33 \pm 1.03 # | 28.00 \pm 1.09 # | 21.78 \pm 1.10 # | 14.44 \pm 1.21 # | 11.22 \pm 1.10 |
| Umereno aktivirana mikroglija (Slika 9 c,d) | AL | 0 | 4.11 \pm 0.56 | 9 \pm 0.87 \$ | 11.2 \pm 1.09 \$ | 2.78 \pm 0.43 \$ |
| | DR | 0 | 3.33 \pm 0.53 | 2.56 \pm 0.58 | 1.33 \pm 0.33 | 0.33 \pm 0.17 |
| Intenzivno aktivirana mikroglija (Slika 9 b) | AL | 0 | 17.89 \pm 0.91 \$ & | 2.56 \pm 0.43 \$ | 1.44 \pm 0.38 | 0.89 \pm 0.35 |
| | DR | 0 | 0.56 \pm 0.24 | 0.44 \pm 0.18 | 0.58 \pm 0.21 | 0.33 \pm 0.19 |
| Ukupan broj mikrogljijskih ćelija | AL | 9.87 \pm 0.81 | 26.44 \pm 1.54 * | 28.22 \pm 1.57 * | 34.77 \pm 1.04 *\$ | 15.45 \pm 0.53 *\$ |
| | DR | 10.33 \pm 1.03 | 31.88 \pm 0.74 # \$ | 24.77 \pm 1.02 # | 16.33 \pm 1.24 # | 11.89 \pm 1.01 |

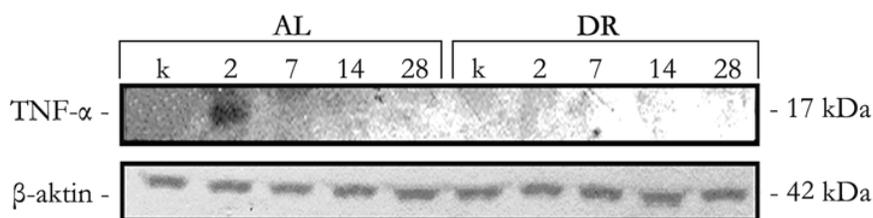
Analiza procentualne zastupljenost različitih stepena aktivacije mikroglije u ukupnoj populaciji izbrojanih mikrogljijskih ćelija oko mesta lezije potvrdila je značajne razlike između AL i DR životinja (Slika 10). U AL grupi aktivirana mikroglija je prisutna u mnogo većem procentu i čini preko 80% mikrogljijskih ćelija u 2. danu, da bi nakon postepenog pada u 28. danu bila zastupljena sa više od 20%. Nasuprot tome, u DR grupi procentualna zastupljenost aktivirane mikroglije tokom čitavog posmatranog perioda od 28 dana nije prešla 15% od ukupne populacije mikrogljijskih ćelija



Slika 10. Procentualna zastupljenost različitih morfoloških stanja mikroglijskih ćelija nakon povrede. Zastupljenost ćelija je izračunata prema podacima iz Tabele 4. k – fiziološka kontrola; 2, 7, 14, 28 – dani nakon povrede.

4.3.2. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju solubilnog TNF- α proteina (17 kDa)

Aktivirane mikroglijske ćelije predstavljaju predominantan izvor proinflammatoryh citokina, a posebno TNF- α . Western blot analizom praćena je ekspresija aktivne forme TNF- α proteina – solubilnog TNF- α (17 kDa) u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga AL i DR pacova tokom oporavka posle povrede (2, 7, 14. i 28. dana) (Slika 11). Indukcija ekspresije solubilnog TNF- α proteina uočena je jedino u AL grupi 2. dana nakon povrede, dok ovaj protein nije detektovan u kasnijim vremenskim tačkama oporavka. Pretretman dijetom u potpunosti je suprimirao indukciju solubilnog TNF- α proteina, tako da ova forma TNF- α proteina nije detektovana ni u jednoj vremenskoj tački oporavka nakon povrede.

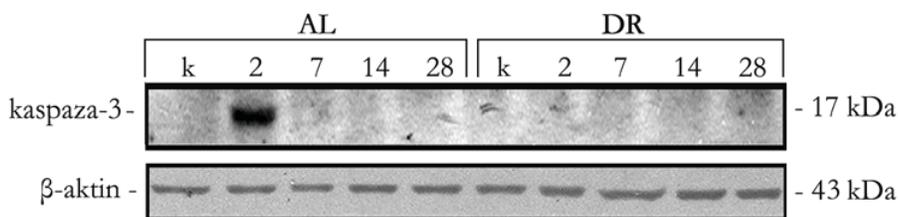


Slika 11. Ekspresija solubilnog TNF- α proteina (17 kDa) u ipsilateralnoj kori mozga AL i DR životinja nakon povrede. Western blot analiza. Slika predstavlja reprezentativni imunoblot; β -aktin je korišćen kao kontrola količine nanetih proteina; k – kontrola; 2, 7, 14, 28. - dani nakon povrede.

4.4. Uticaj dijetalne restrikcije na sekundarnu smrt nervnih ćelija u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede

4.4.1. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju aktivne kaspaze-3 (17kDa)

Imajući u vidu da povišeni nivo TNF- α proteina pokreće kaspazno-zavisnu apoptozu (Rath i Aggarwal, 1999) od interesa je bilo ispitati promene u ekspresionom profilu velike subjedinice kaspaze-3 (17 kDa) u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga AL i DR pacova tokom oporavka (2-28 dana) nakon povrede (Slika 12). Western blot analizom utvrđeno je da u AL grupi životinja dolazi do indukcije ekspresije 17 kDa fragmenta kaspaze-3 jedino u 2. danu, ali ne i u ostalim vremenskim tačkama oporavka nakon povrede. Ovakav ekspresioni profil aktivne kaspaze-3 kod AL životinja identičan je profilu TNF- α proteina. U DR grupi životinja nije detektovana ekspresija aktivne kaspaze-3 ni u jednoj vremenskoj tački oporavka nakon povrede..

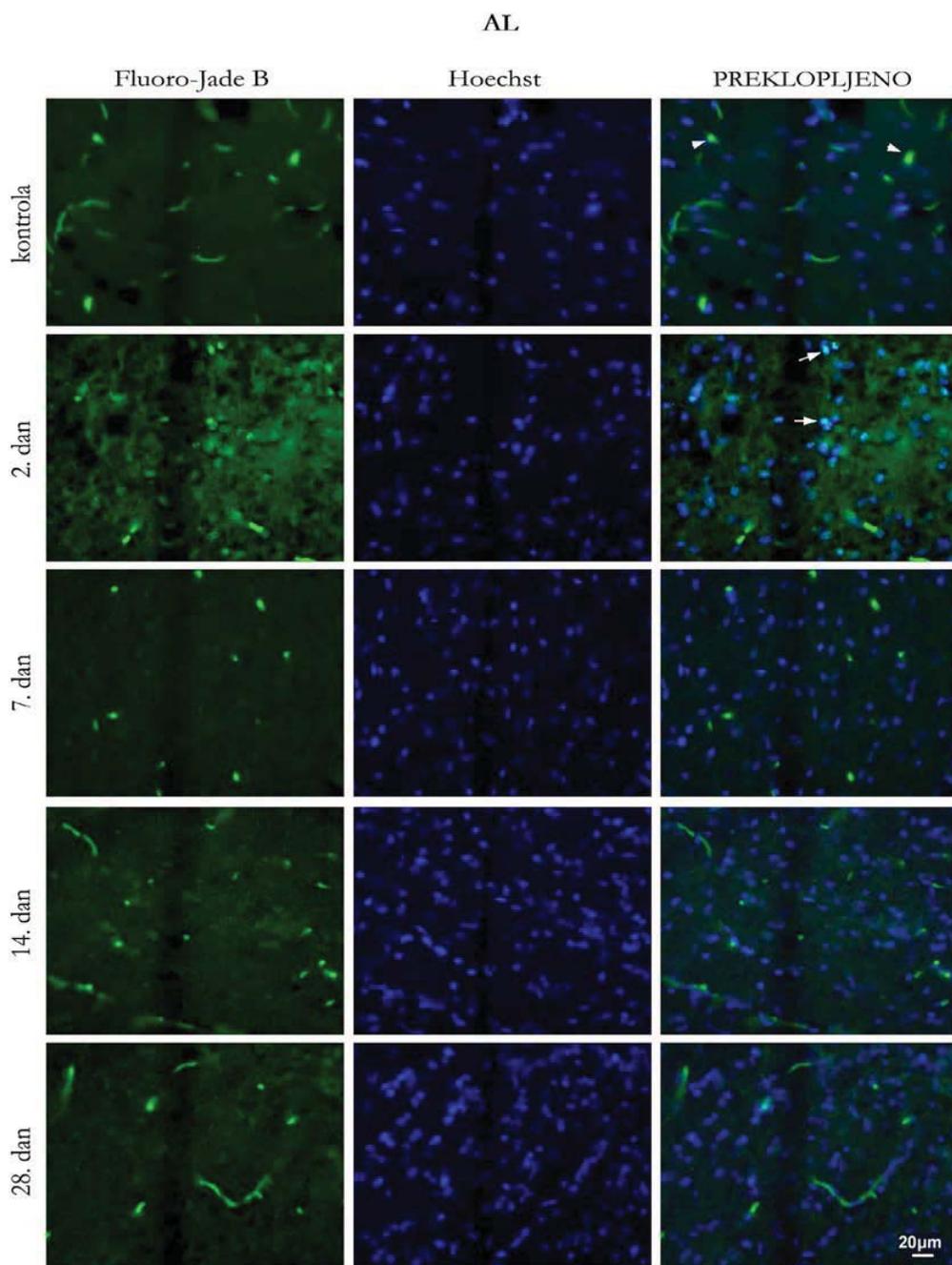


Slika 12. Promene u ekspresiji velike subjedinice kaspaze-3 (17 kDa) u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga AL i DR životinja nakon povrede. Western blot analiza. Slika predstavlja reprezentativni imunoblot; β -aktin je korišćen kao kontrola količine nanetih proteina; k – kontrola; 2, 7, 14, 28. - dani nakon povrede.

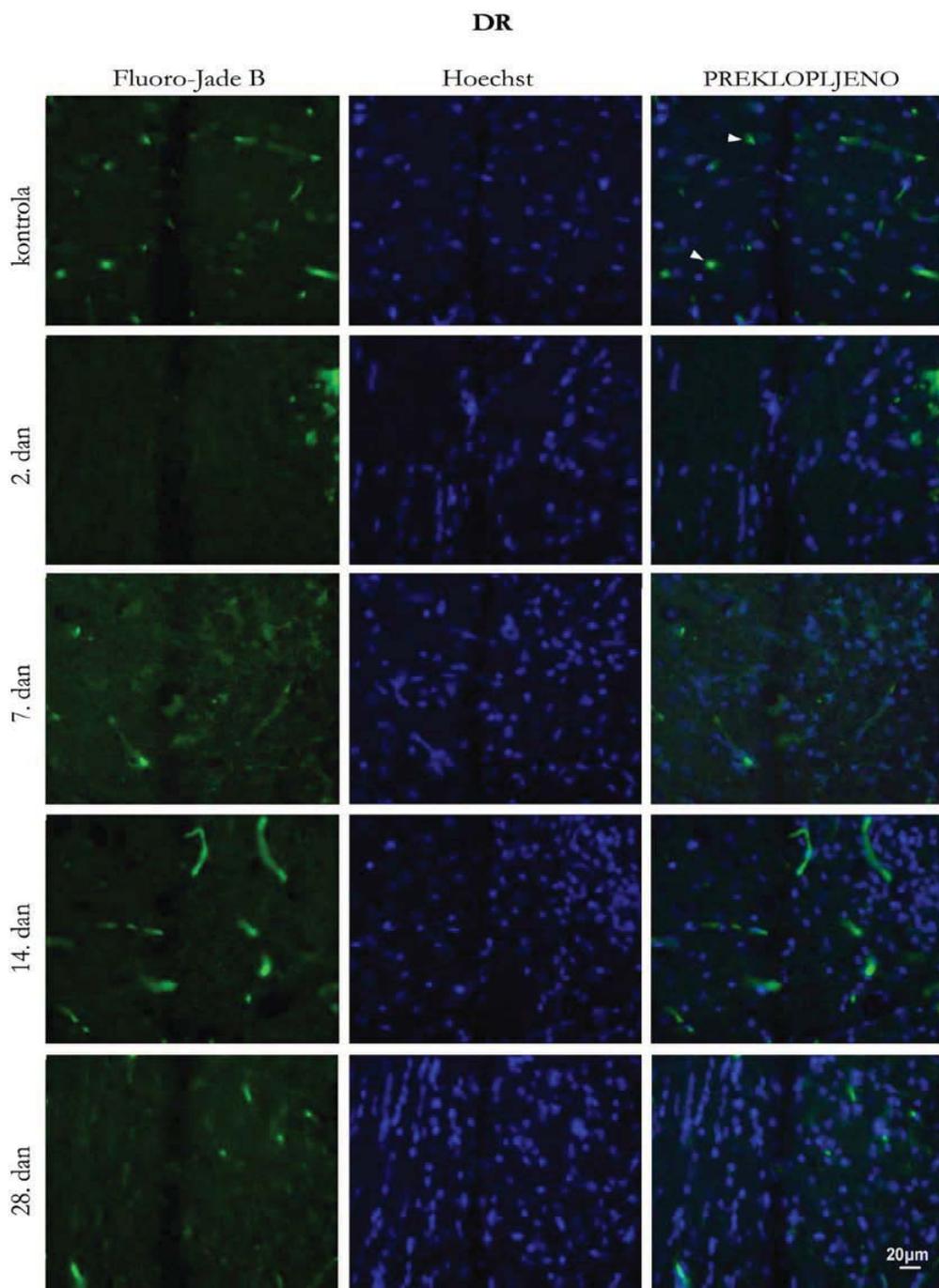
4.4.2. Uticaj dijetalne restrikcije na preživljavanje neurona nakon povrede

Da bi utvrdili da li je povreda mozga dovela do sekundarne neurodegeneracije izvršeno je Fluoro-Žad B/Hoechst 33258 dvojno bojenje preseka mozgovia AL i DR životinja tokom oporavka (2, 7, 14. i 28. dana) nakon povrede (Slika 13). Neuronu u degeneraciji uočeni su u tkivu oko same lezije samo kod AL životinja u 2. danu nakon povrede (preklopljena slika; strelice). Neuronu u degeneraciji nisu uočeni na presecima mozga DR životinja ni u jednoj vremenskoj tački nakon povrede (Slika 14).

Histološkom analizom moždanog tkiva nije detektovano prisustvo Fluoro-Žad B pozitivnih ćelija u mozgovima kontrolnih AL i DR životinja (Slike 13 i 14, kontrola).



Slika 13. Fluoro Žad-B i Hoechst imunobojenje preseka mozga AL životinja u 2, 7, 14. i 28. danu nakon povrede. Fluoro-žad B bojenje (leva kolona), Hoechst 33258 bojenje (srednja kolona) i preklopljene slike (desna kolona) reprezentativnih preseka mozgovu u nivou lezije. U redovima su prikazani dani nakon povrede. Fluoro-žad B pozitivne ćelije su obeležene strelicama, dok su krvni sudovi obeleženi glavom strelice. Uveličanje 40x; skala=20 µm.

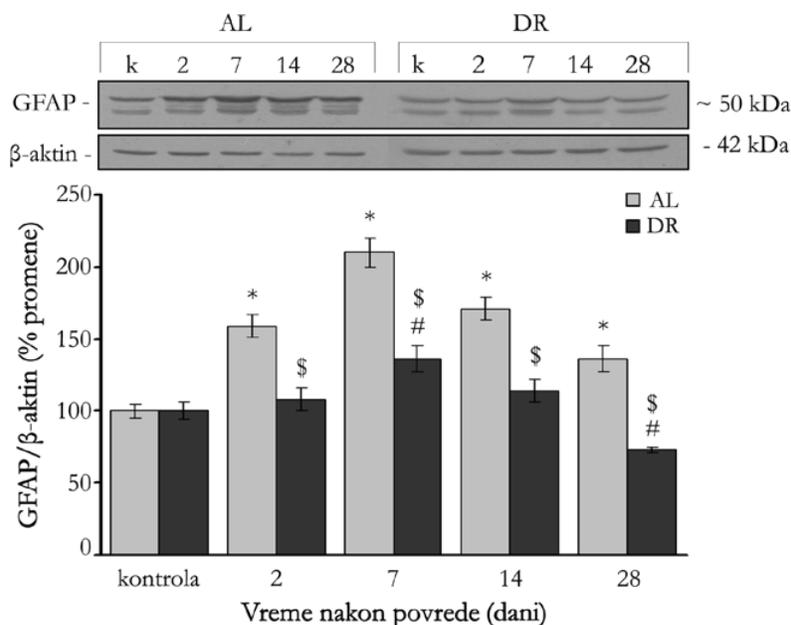


Slika 14. Fluoro Žad-B i Hoechst imunobojenje preseka mozga DR životinja u 2, 7, 14. i 28. danu nakon povrede. Fluoro-žad B bojenje (leva kolona), Hoechst 33258 bojenje (srednja kolona) i preklopljene slike (desna kolona) reprezentativnih preseka mozgovu u nivou lezije. U redovima su prikazani dani nakon povrede. Krvni sudovi su obeleženi glavom strelice. Uveličanje 40x; skala=20 µm.

4.5. Uticaj dijetalne restrikcije na aktivaciju astrocita u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede

4.5.1. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju GFAP proteina

Ekspresija GFAP proteina u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede (2-28 dana) praćena je Western blot analizom (Slika 15). Dvofaktorska ANOVA pokazala je znaćajan efekat za faktor dijetalna restrikcija ($F(1,36)=136.881$, $p<0.05$) i faktor vreme ($F(3,36)=25.714$, $p<0.05$). U AL grupi nivo GFAP proteina je statistiĉki znaćajno porastao i to za: 59% u 2. danu, 110% u 7. danu, 71% u 14. danu i 36% u 28. danu nakon povrede u poređenju sa odgovarajućom AL kontrolom ($*p<0.05$). U DR grupi životinja uoćen je bifazni trend promena nivoa GFAP proteina u poređenju sa odgovarajućom kontrolom: porast od 36% u 7. danu i pad od 27% u 28. danu nakon povrede ($\#p<0.05$). *Post hoc* analizom utvrđen je znaćajno manji stepen ekspresije GFAP proteina kod DR životinja u poređenju sa nivoom ovog proteina kod AL životinja u svim vremenskim taćkama oporavka nakon povrede ($\$p<0.05$). Western blot analiza nije otkrila znaćajne razlike u ekspresiji GFAP proteina izmeću kontrolnih AL i DR životinja.

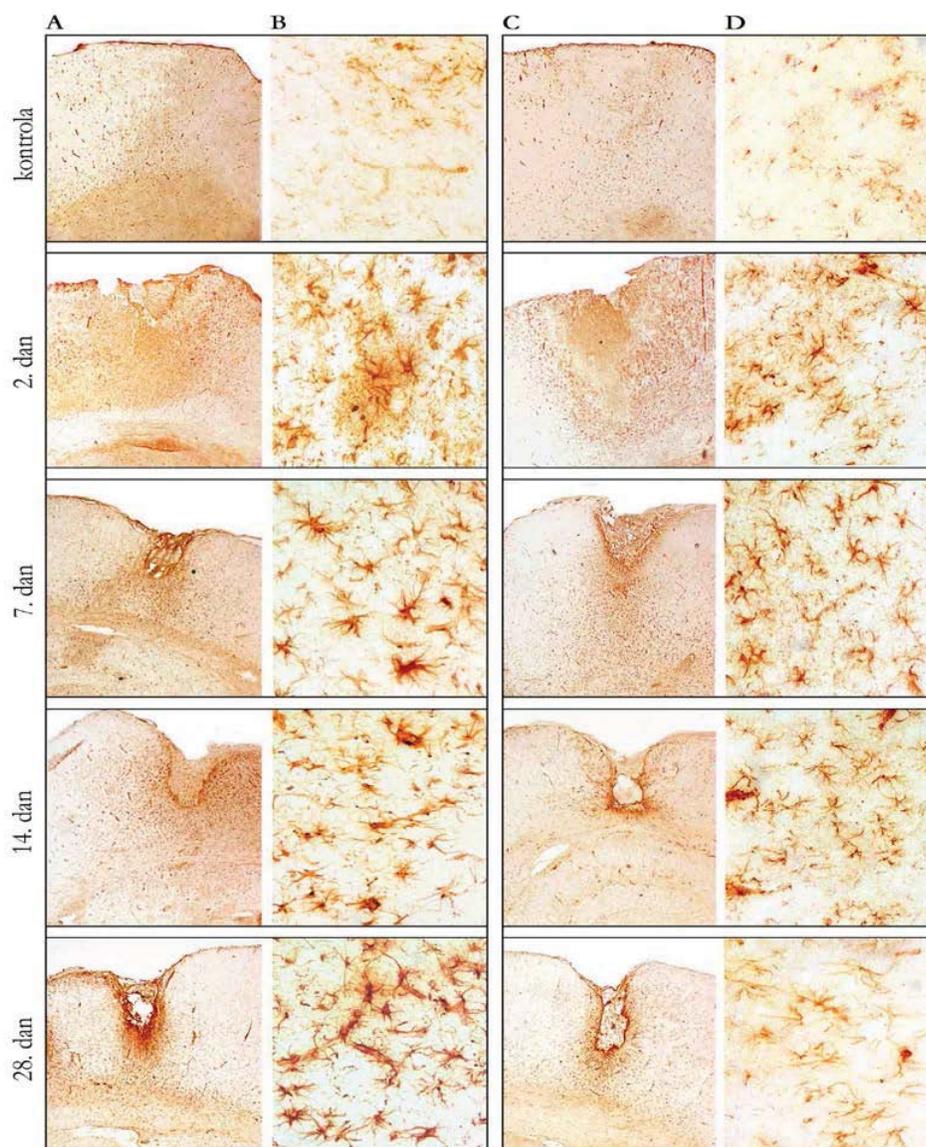


Slika 15. Promene u ekspresiji GFAP proteina u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga AL i DR životinja nakon povrede. Western blot analiza. Relativne vrednosti nivoa GFAP proteina su normalizovane u odnosu na ekspresiju β -aktina. Rezultati su izraćeni kao procenat (%) promene u odnosu na kontrolnu vrednost (fiziološka kontrola 100%). Prikazan je reprezentativni imunoblot. $*p<0,05$ u odnosu na AL kontrolu; $\#p<0,05$ u odnosu na DR kontrolu; $\$p<0,05$ u odnosu na odgovarajuću vremensku taćku za AL.

4.5.2. Uticaj dijetalne restrikcije na morfološke karakteristike astrocita

Ekspresija GFAP proteina praćena je i imunohistohemijskom analizom (Slika 16). U AL grupi životinja detektovan je veliki broj GFAP pozitivnih ćelija u obliku šire regije oko mesta lezije u svim vremenskim tačkama oporavka nakon povrede (Slika 16A; 2,5x uvećanju). Do 28. dana u AL grupi se uočava formiranje izraženog glijskog ožiljka oko mesta povrede, kao i značajne promene u morfologiji astrocita (Slika 16B; 40x uvećane) koje ukazuju na pojavu reaktivne astroglioze. U AL grupi životinja morfološke promene astrocita uočljive su tokom čitavog posmatranog perioda od 28 dana, a najizraženije su u 7. danu nakon povrede. Kod AL životinja se reaktivni astrociti uočavaju se tokom čitavog perioda oporavka, ne samo oko mesta lezije, već i u delovima ipsilateralne kore mozga koji su udaljeni od same povrede.

Najznačajnija razlika između AL i DR grupe u izgledu povređenog regiona uočena je 28. dana nakon povrede (posmatrano pri 2,5x uvećanju). Za razliku od robusnog glijskog ožiljka koji se javlja u AL grupi, u DR grupi životinja ovaj ožiljak sveden je na veoma tanak, rastresit sloj GFAP-pozitivnih ćelija oko mesta povrede. Tu se astrociti, iako reaktivni, karakterišu daleko manje hipertrofiranim ćelijskim telima i nastavcima nego što je to slučaj sa astrocitima AL životinja (Slika 16D; 40x uvećanje). Do 28. dana astrociti u DR grupi ponovo zadobijaju nereaktivnu morfologiju, koja se uočava i u mozgu kontrolnih životinja. Imunohistohemijskom analizom nisu otkrivene razlike u ekspresiji GFAP proteina, kao ni razlike u morfologiji astrocita između kontrolnih AL i DR životinja (Slika 16, kontrola).

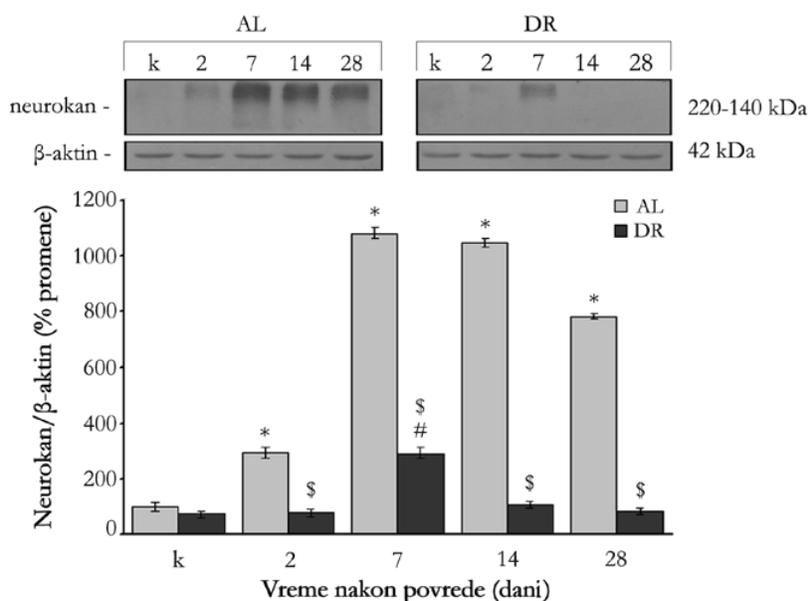


Slika 16. GFAP imunobojenje kod AL i DR životinja 2, 7, 14. i 28. dana nakon povrede. Reprezentativni preseci mozgova AL (red A i B) i DR (red C i D) životinja. Uveličanje 2,5x; skala 500µm (red A i C). Uveličanje 40x; skala 40µm (red B i D).

4.5.3. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju inhibitorynog proteoglikana neurokana

Reaktivni astrociti predstavljaju predominantan izvor inhibitorynog hondroitin sulfatnog proteoglikana neurokana na mestu povrede. Western blot analizom su praćene promene u nivou neurokana u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga AL i DR pacova tokom

oporavka (2, 7, 14. i 28. dana) nakon povrede (Slika 17). Statistička analiza rezultata (dvofaktorska ANOVA) pokazala je značajan efekat za faktor dijetalna restrikcija ($F(1,25)=123.641$, $p<0.05$) i faktor vreme ($F(3,25) = 18.352$, $p<0.05$). Ekspresija neurokana u AL grupi je u odnosu na odgovarajuću AL kontrolu značajno povećana tokom celog perioda oporavka i to: 2. dana (3 puta), 7. dana (11 puta), 14. dana (10,5 puta) i 28. dana (7,5 puta) u odnosu na kontrolu ($*p<0.05$). Kod životinja koje pripadaju DR grupi, jedino je u 7. danu statistički značajno povećana ekspresija neurokana (3,5 puta) u odnosu na odgovarajuću kontrolu ($\#p<0.05$). *Post hoc* analizom je utvrđen značajno povišen nivo neurokana kod AL životinja u poređenju sa nivoom ovog proteoglikana kod DR životinja u svim vremenskim tačkama oporavka ($\$p<0.05$). Nisu uočene značajne razlike u ekspresiji neurokana između kontrolnih AL i DR životinja.

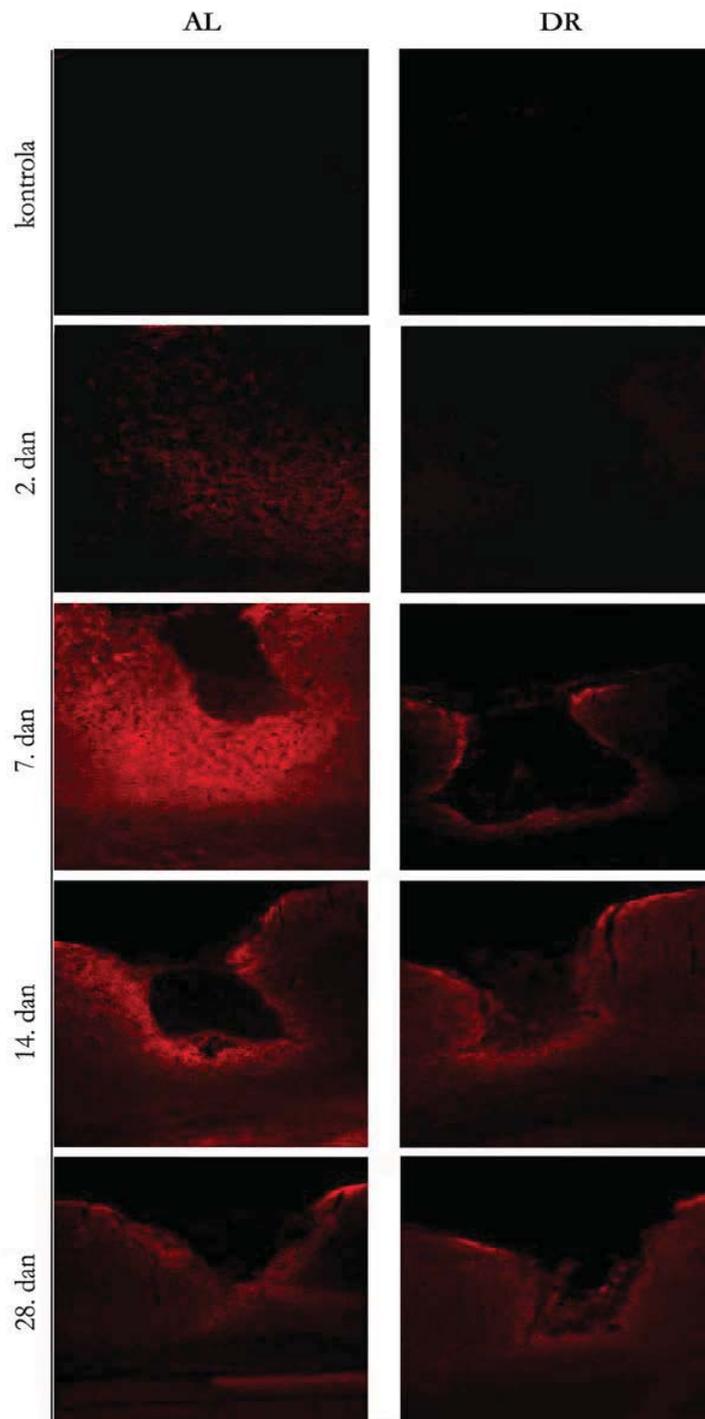


Slika 17. Promene u ekspresiji neurokana u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga AL i DR životinja nakon povrede. Western blot analiza. Relativne vrednosti nivoa neurokana su normalizovane u odnosu na ekspresiju β -aktina. Rezultati su izraženi kao procenat (%) promene u odnosu na kontrolnu vrednost (fiziološka kontrola 100%). Prikazan je reprezentativni imunoblot. $*p<0,05$ u odnosu na AL kontrolu; $\#p<0,05$ u odnosu na DR kontrolu; $\$p<0,05$ u odnosu na odgovarajuću vremensku tačku za AL.

Ekspresija neurokana praćena je i imunohistohemijskom metodom (Slika 18). Kod AL životinja se imunobojenje na neurokan uočava oko mesta povrede tokom čitavog perioda oporavka (B-E). Najintenzivnija ekspresija neurokana kod AL životinja uočena je u 7. danu oko mesta povrede, kada imunoreakcija zahvata širi region oko mesta lezije (Slika

18C). Kod DR životinja ekspresija neurokana uočena je u periodu od 7. do 28. dana nakon povrede (Slika 18 H-J), a intenzitet imunobojenja u 7. danu kod DR životinja bio je vidno slabiji u odnosu na istu vremensku tačku kod AL životinja (Slika 18C i H) .

Posmatrajući imunobojenje preseka mozga AL i DR životinja uočava se da su razlike u ekspresiji neurokana između ove dve grupe životinja u 14. i 28. danu daleko manje od razlika u ekspresiji uočenih Western blot metodom.

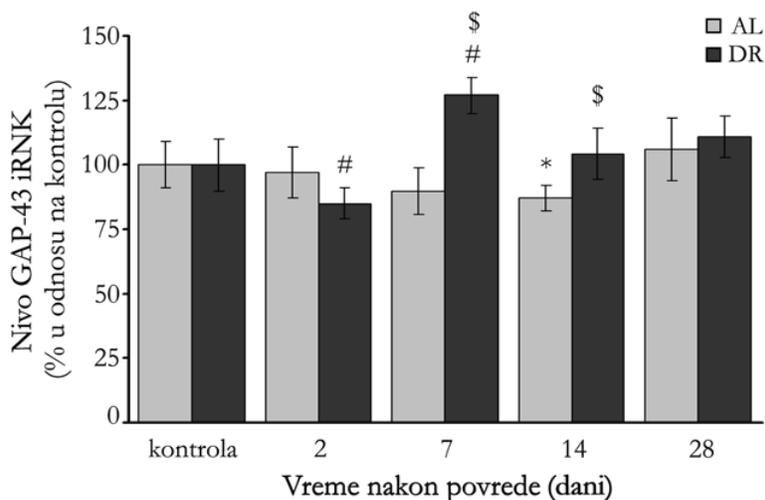


Slika 18. Neurokan imunobojenje kod AL i DR životinja 2, 7, 14. i 28. dana nakon povrede. Reprezentativni preseći mozgovia AL (leva kolona) i DR (desna kolona) životinja; Uveličanje 5x; Skala 200 μ m; kontrola, 2, 7, 14, 28. - dani nakon povrede.

4.6 Uticaj dijetalne restrikcije na procese plastičnosti nakon povrede

4.6.1. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju iRNK za GAP-43 u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede

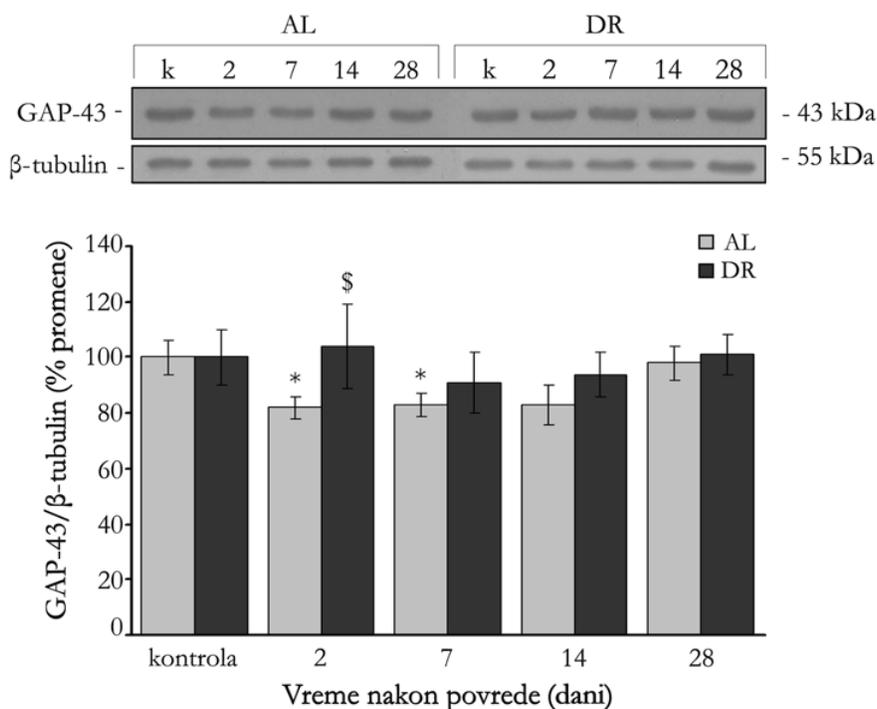
Promene nivoa ekspresije iRNK za GAP-43 u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova AL i DR grupe životinja tokom oporavka (2, 7, 14. i 28. dana) nakon povrede, praćene su metodom RT-PCR analize u realnom vremenu (Slika 19). Utvrđen je značajan pad nivoa ekspresije iRNK za GAP-43 u AL grupi u 14. danu nakon povrede (17%) u odnosu na odgovarajuću AL kontrolu (* $p < 0,05$). U DR grupi dolazi do značajnog pada ekspresije iRNK za GAP-43 (20%) u 2. danu, ali i značajnog porasta (27%) u 7. danu nakon povrede u poređenju sa odgovarajućom DR kontrolom (# $p < 0,05$). U odnosu na AL grupu ekspresija iRNK za GAP-43 u DR grupi raste u 7. (47%) i 14. (29%) danu nakon povrede (\$ $p < 0,05$). Nije uočena razlika u ekspresiji iRNK za GAP-43 između kontrolnih AL i DR životinja.



Slika 19. Promene u ekspresiji iRNK za GAP-43 kod AL i DR životinja nakon povrede. Rezultati su dobijeni metodom RT-PCR analize u realnom vremenu na tkivu ipsilateralne kore prednjeg mozga AL i DR životinja, 2, 7, 14 i 28 dana nakon povrede i izraženi kao procenat (%) promene u odnosu na kontrolnu vrednost (fiziološka kontrola 100%). * $p < 0,05$ u odnosu na AL kontrolu; # $p < 0,05$ u odnosu na DR kontrolu; \$ $p < 0,05$ u odnosu na odgovarajuću vremensku tačku za AL.

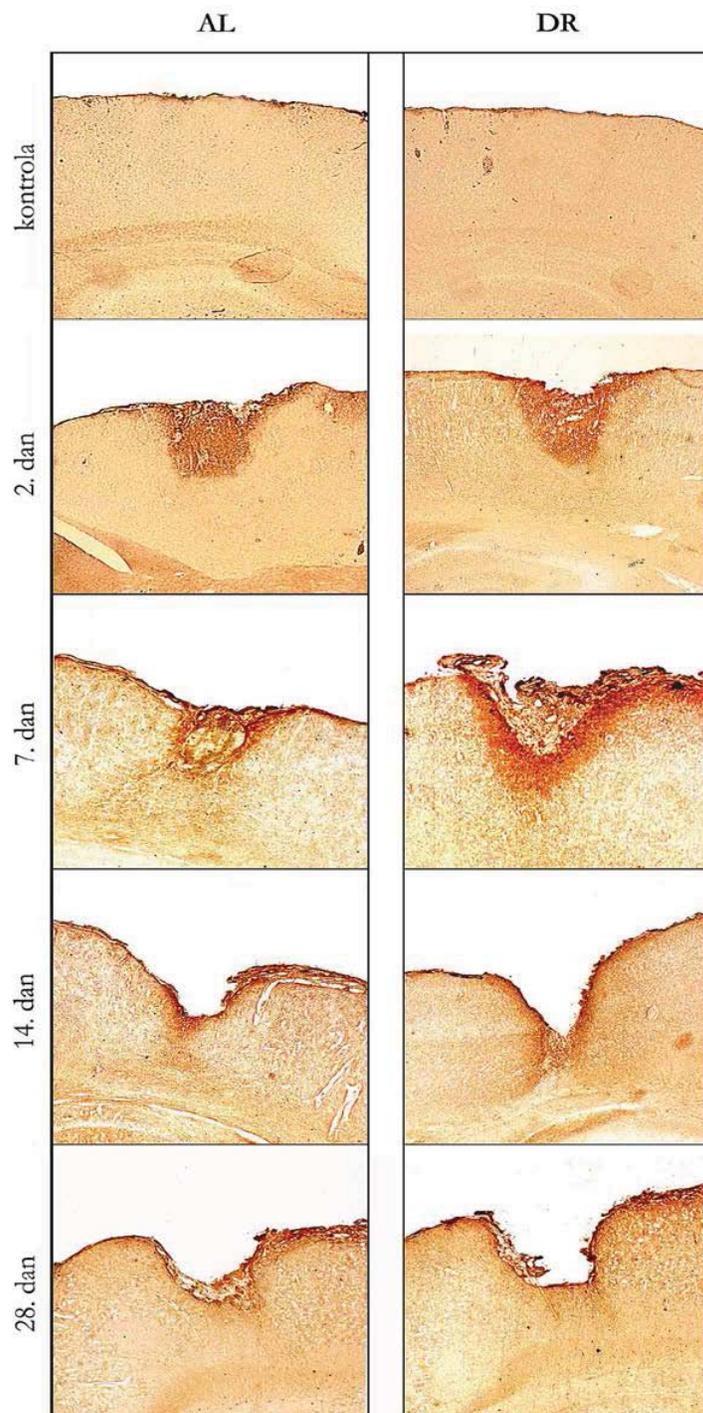
4.6.2. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju GAP-43 proteina u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede

Promene nivoa GAP-43 proteina u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede (2-28 dana) praćena je Western blot analizom (Slika 20). Dvofaktorska ANOVA pokazala je značajan efekat samo za faktor dijetalne restrikcije ($F(1,32) = 8.425$, $p < 0.05$). U AL grupi, postojala je tendencija pada nivoa GAP-43 proteina u vremenskom periodu od 2. do 14. dana nakon povrede u poređenju sa odgovarajućom AL kontrolom, pri čemu je statistički značajan pad uočen u 2. (21%) i 7. (17%) danu nakon povrede ($*p < 0.05$). U DR grupi nivo GAP-43 proteina ostao je nepromenjen tokom čitavog vremena oporavka u poređenju sa vrednostima odgovarajuće DR kontrole. *Post hoc* analiza pokazala je značajan pad ekspresije GAP-43 proteina u AL grupi 2. dana nakon povrede (25%) u odnosu na DR grupu životinja ($\$p < 0.05$). Nije uočena razlika u ekspresiji GAP-43 proteina između kontrolnih AL i DR životinja.



Slika 20. Promene u ekspresiji GAP-43 proteina u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga AL i DR životinja nakon povrede. Western blot analiza. Relativne vrednosti nivoa GAP-43 proteina su normalizovane u odnosu na ekspresiju β -tubulina. Rezultati su izraženi kao procenat (%) promene u odnosu na kontrolnu vrednost (fiziološka kontrola 100%). Prikazan je reprezentativni imunoblot. $*p < 0,05$ u odnosu na AL kontrolu; $\$p < 0,05$ u odnosu na odgovarajuću vremensku tačku za AL.

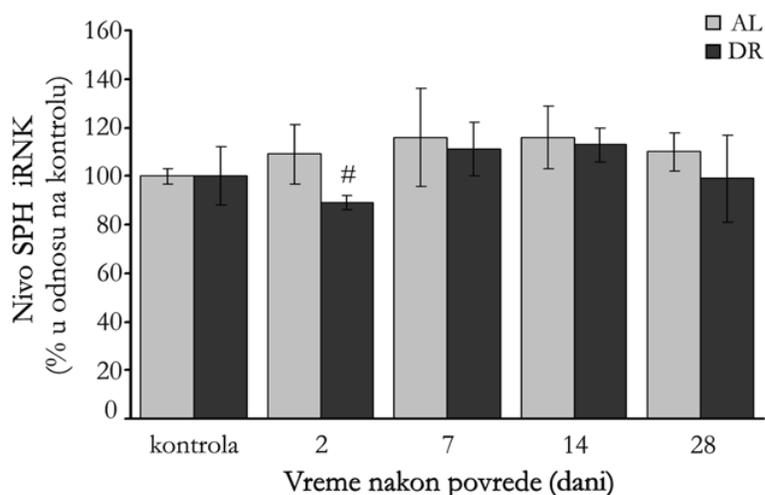
Ekspresija GAP-43 proteina praćena je i imunohistohemijskom metodom (Slika 21). Izraženo imunobojenje na GAP-43 protein detektovano je samo u DR grupi i to 7. dana nakon povrede. Za razliku od DR grupe, na presecima mozga AL životinja nije uočena imunoreakcija u 7. danu nakon povrede. Imunobojenje na GAP-43 nije uočeno u ostalim vremenskim tačkama nakon povrede ni u AL ni u DR grupi životinja. Imunohistohemijskom analizom nisu detektovane razlike u ekspresiji GAP-43 proteina između kontrolnih AL i DR životinja.



Slika 21. GAP-43 imunobojenje kod AL i DR životinja 2, 7, 14. i 28. dana nakon povrede. Reprezentativni preseći mozgovia AL (leva kolona) i DR (desna kolona) životinja; Uveličanje 5x; Skala 200 μ m; kontrola, 2, 7, 14, 28. - dani nakon povrede.

4.6.3. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju iRNK za sinaptofizin u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede

Promene nivoa ekspresije iRNK za sinaptofizin u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova AL i DR grupe životinja tokom oporavka, od 2. do 28. dana nakon povrede, praćene su korišćenjem RT-PCR analize u realnom vremenu (Slika 22). Analizom rezultata nisu uočene značajne promene u ekspresiji iRNK za sinaptofizin u AL i DR grupi u poređenju sa odgovarajućim kontrolama. Daljom analizom ekspresije iRNK za sinaptofizin u DR grupi u odnosu na AL grupu, detektovan je pad ekspresije sinaptofizina od 23% u 2. danu nakon povrede u AL grupi životinja ($p < 0,05$). Nije uočena razlika u ekspresiji iRNK za sinaptofizin između kontrolnih AL i DR životinja.

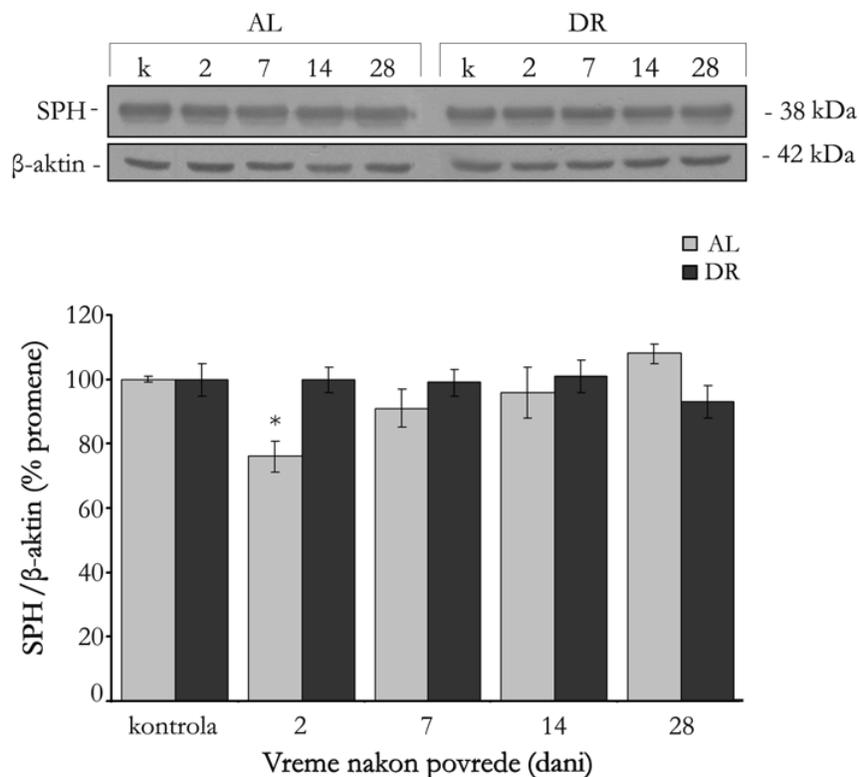


Slika 22. Promene u ekspresiji iRNK za SPH kod AL i DR životinja nakon povrede. Rezultati su dobijeni metodom RT-PCR analize u realnom vremenu na tkivu ipsilateralne kore prednjeg mozga AL i DR životinja, 2, 7, 14 i 28 dana nakon povrede i izraženi kao procenat (%) promene u odnosu na kontrolnu vrednost (fiziološka kontrola 100%). # $p < 0,05$ u odnosu na DR kontrolu.

4.6.4. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju proteina sinaptofizina u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede

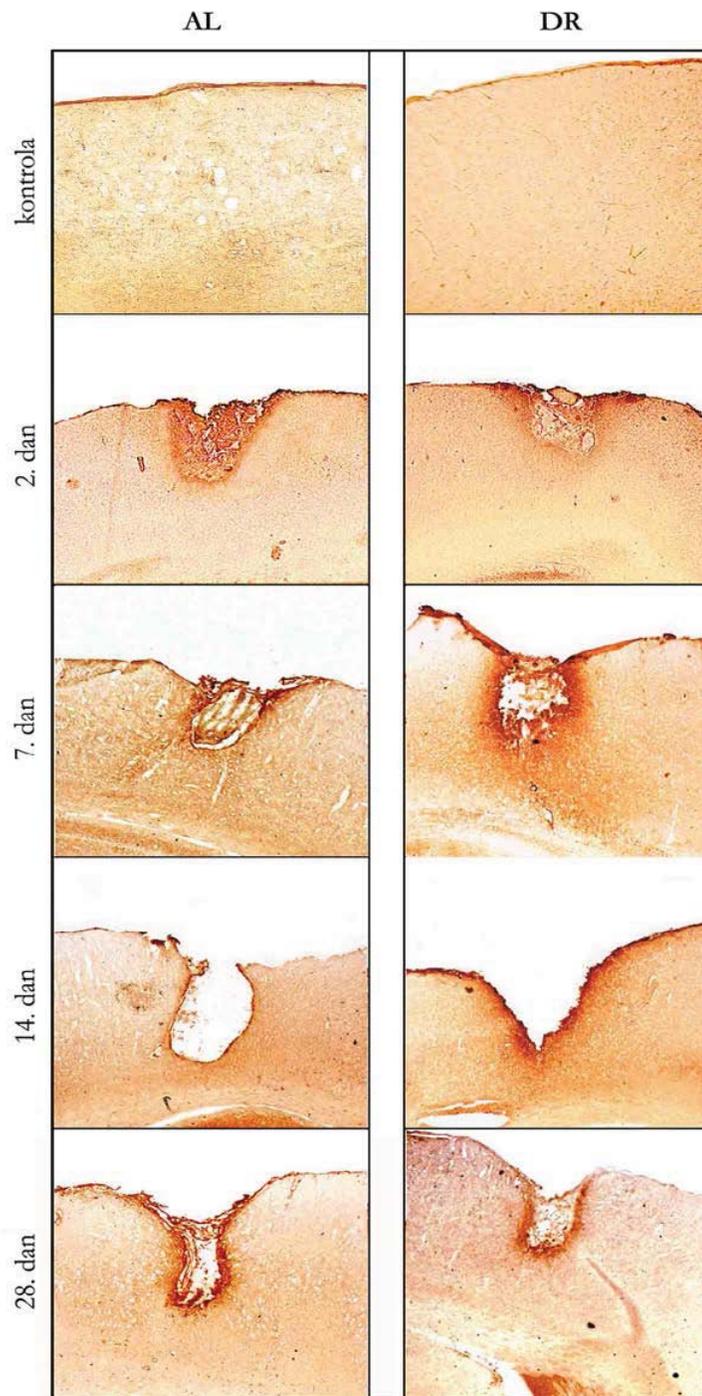
Western blot analiza korišćena je kako bi se pratile promene nivoa proteina sinaptofizina u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga AL i DR pacova u periodu od 2. do 28. dana nakon povrede (Slika 23). Dvofaktorska ANOVA pokazala je značajan efekat samo za interakciju faktora dijetalne restrikcije i vremena ($F(1,30) = 3.784$, $p < 0.05$). U AL grupi statistički značajan pad nivoa SPH od 24% detektovan je 2. dana nakon povrede u

poređenju sa odgovarajućom AL kontrolom (* $p < 0.05$). U DR grupi nivo SPH ostao je nepromenjen tokom čitavog vremena oporavka u poređenju sa vrednostima odgovarajuće DR kontrole. *Post hoc* analiza pokazala je značajan pad ekspresije SPH od 24% u AL grupi 2. dana nakon povrede u odnosu na DR grupu životinja ($p < 0.05$). Nije uočena razlika u ekspresiji SPH između kontrolnih AL i DR životinja.



Slika 23. Promene u ekspresiji SPH u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga AL i DR životinja nakon povrede. Western blot analiza. Relativne vrednosti nivoa SPH su normalizovane u odnosu na ekspresiju β -aktina. Rezultati su izraženi kao procenat (%) promene u odnosu na kontrolnu vrednost (fiziološka kontrola 100%). Prikazan je reprezentativni imunoblot. * $p < 0.05$ u odnosu na AL kontrolu.

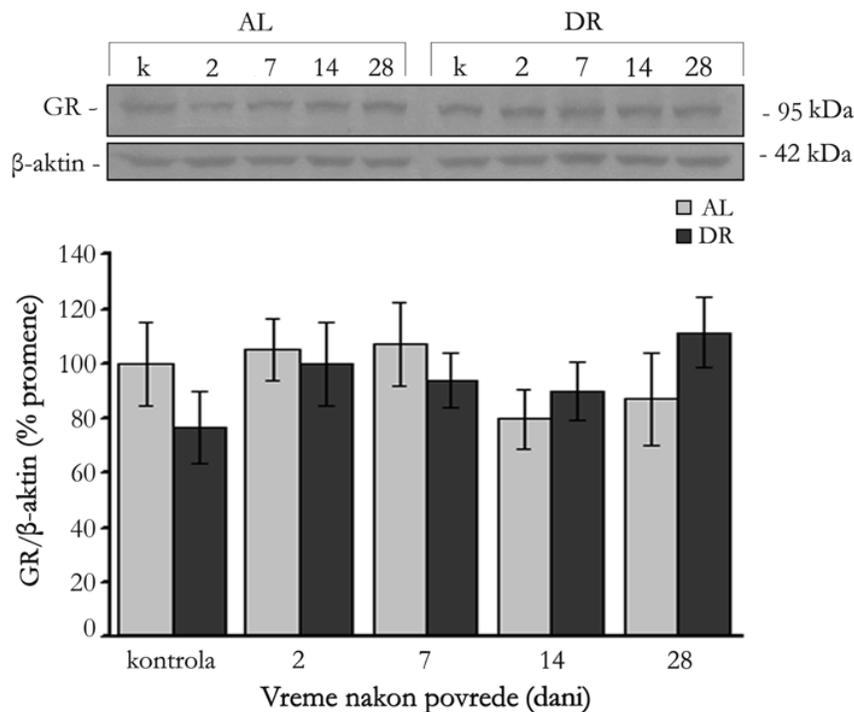
Ekspresija SPH praćena je i imunohistohemijskom metodom (Slika 24). Izraženo imunobojenje na SPH detektovano je samo u DR grupi i to 7. dana nakon povrede. Za razliku od DR grupe, na presecima mozga AL životinja nije uočena imunoreakcija u 7. danu nakon povrede. SPH imunobojenje nije uočeno u ostalim vremenskim tačkama nakon povrede ni u AL niti u DR grupi životinja. Imunohistohemijskom analizom nisu otkrivene razlike u ekspresiji SPH proteina između kontrolnih AL i DR životinja.



Slika 24. SPH imunobojenje kod AL i DR životinja 2, 7, 14. i 28. dana nakon povrede. Reprezentativni preseći mozga AL (leva kolona) i DR (desna kolona) životinja; Uveličanje 5x; Skala 200 μ m; kontrola, 2, 7, 14, 28. - dani nakon povrede.

4.7. Uticaj dijetalne restrikcije na nivo ukupnog i fosforilisanog GR-a u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede

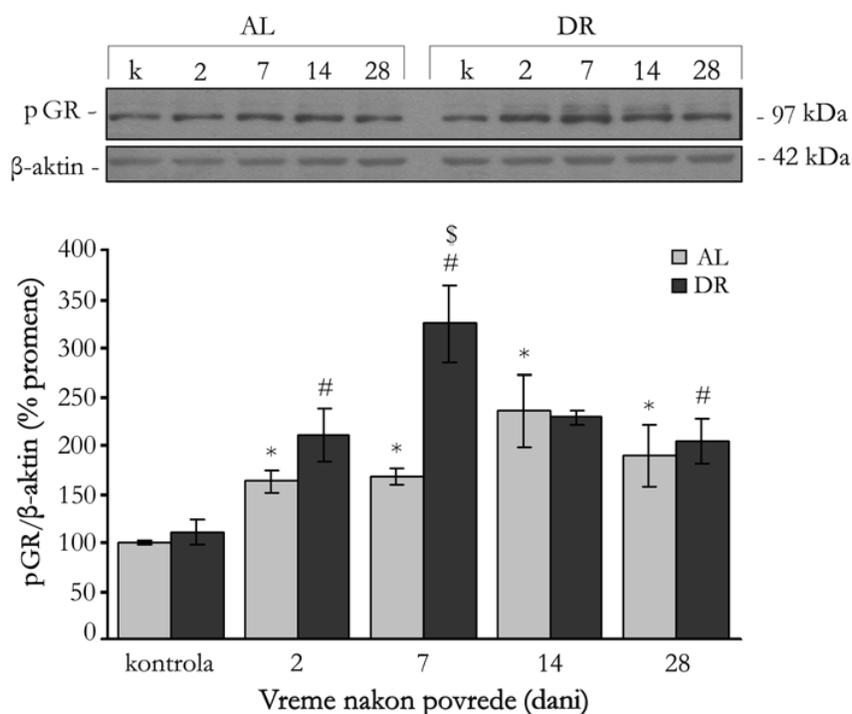
Promene nivoa ukupnog GR-a (94kDa) u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova praćene su Western blot analizom u periodu od 2. do 28. dana nakon povrede (Slika 25). Dvofaktorska ANOVA pokazala je da ne postoje značajni efekti za faktore vreme i dijetalna restrikcija, kao ni za njihovu interakciju.



Slika 25. Promene u ekspresiji GR-a u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga AL i DR životinja nakon povrede. Western blot analiza. Relativne vrednosti nivoa GR-a su normalizovane u odnosu na ekspresiju β-aktina. Rezultati su izraženi kao procenat (%) promene u odnosu na kontrolnu vrednost (fiziološka kontrola 100%). Prikazan je reprezentativni imunoblot.

Western blot analizom praćene su i promene u ekspresiji fosfoizoforne GR-a, (pGR) koja nastaje fosforilacijom na Serinu 211 i smatra se surogat markerom aktivnosti GR (Slika 26). Dvofaktorska ANOVA pokazala je značajan efekat faktora dijetalne restrikcije ($F(1,40)=13,400$; $p<0.05$), vremena ($F(4,40)=16,279$; $p<0.05$) kao i interakcije faktora restrikcija i vreme ($F(4,40)=5,603$; $p<0.05$). Nivo ekspresije pGR bio je značajno povećan kod obe grupe životinja (AL i DR) u svim vremenskim tačkama (2, 7, 14. i 28. dan) nakon povrede u poređenju sa odgovarajućim kontrolama. U AL grupi životinja nivo

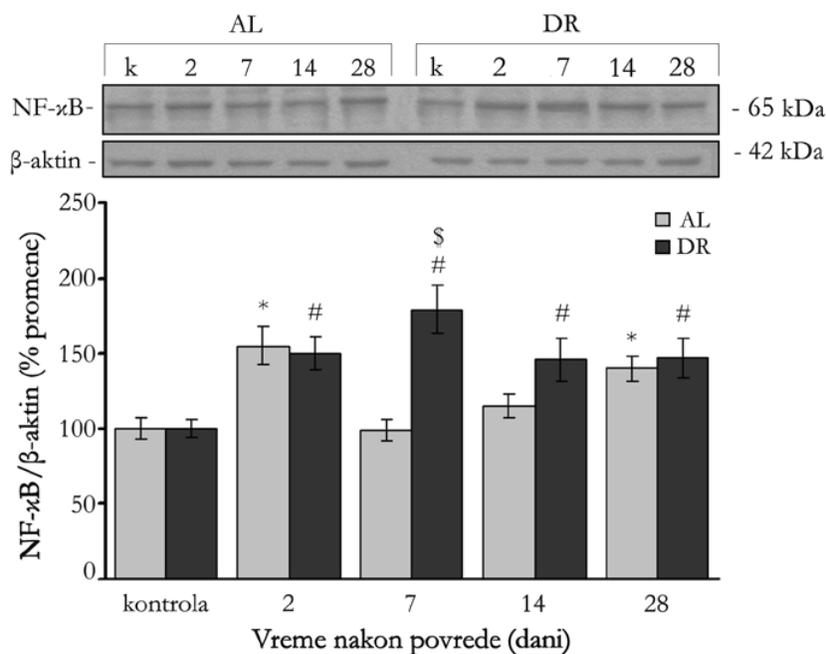
ekspresije bio je povećan za: 63% u 2. danu, 68% u 7. danu, 136% u 14. danu i 89% u 28. danu nakon povrede u poređenju sa odgovarajućom AL kontrolom (* $p < 0.05$). U DR grupi životinja nivo ekspresije pGR bio je povećan za: 111% u 2. danu, 225% u 7. danu, 129% u 14. danu i 104% u 28. danu nakon povrede u poređenju sa odgovarajućom kontrolom za DR grupu (# $p < 0.05$). *Post hoc* analiza pokazala je značajan porast nivoa fosfoizoforme u 7. danu u DR grupi u odnosu na vrednosti dobijene za AL grupu u istoj vremenskoj tački (\$ $p < 0.05$). Nije uočena razlika u ekspresiji pGR između kontrolnih AL i DR životinja.



Slika 26. Promene u ekspresiji pGR u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga AL i DR životinja nakon povrede. Western blot analiza. Relativne vrednosti nivoa pGR su normalizovane u odnosu na ekspresiju β-aktina. Rezultati su izraženi kao procenat (%) promene u odnosu na kontrolnu vrednost (fiziološka kontrola 100%). Prikazan je reprezentativni imunoblot. * $p < 0,05$ u odnosu na AL kontrolu; # $p < 0,05$ u odnosu na DR kontrolu; \$ $p < 0,05$ u odnosu na odgovarajuću vremensku tačku za AL.

4.8. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju p65 subjediniice NF κ B proteina u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede

Western blot analizom je utvrđeno da povreda mozga dovodi do promene ekspresije p65 subjediniice NF κ B proteina kako kod AL, tako i kod DR životinja (Slika 27). Dvofaktorska ANOVA pokazala je značajan efekat faktora dijetalne restrikcije ($F(1,50)=16,605$; $p<0.05$), vremena ($F(4,50)=8,164$; $p<0.05$) kao i interakcije faktora restrikcija x vreme ($F(4,50)=6,774$; $p<0.05$). U AL grupi ekspresija NF κ B (p65) proteina bila je značajno povišena za 52% u 2. danu i 39% u 28. danu nakon povrede u poređenju sa odgovarajućom AL kontrolom (* $p<0.05$). U DR grupi detektovan je značajan porast nivoa NF κ B (p65) proteina u svim vremenskim tačkama i to: 48% u 2. danu, 77% u 7. danu, 41% u 14. danu i 42% u 28. danu nakon povrede u poređenju sa odgovarajućom DR kontrolom (\$ $p<0.05$). *Post hoc* analiza pokazala je značajan porast ekspresije NF κ B (p65) proteina u DR grupi u 7. danu nakon povrede (76%) u poređenju sa odgovarajućom vremenskom tačkom za AL grupu (# $p<0.05$). Nije uočena razlika u ekspresiji p65 subjediniice NF κ B proteina između kontrolnih AL i DR životinja.



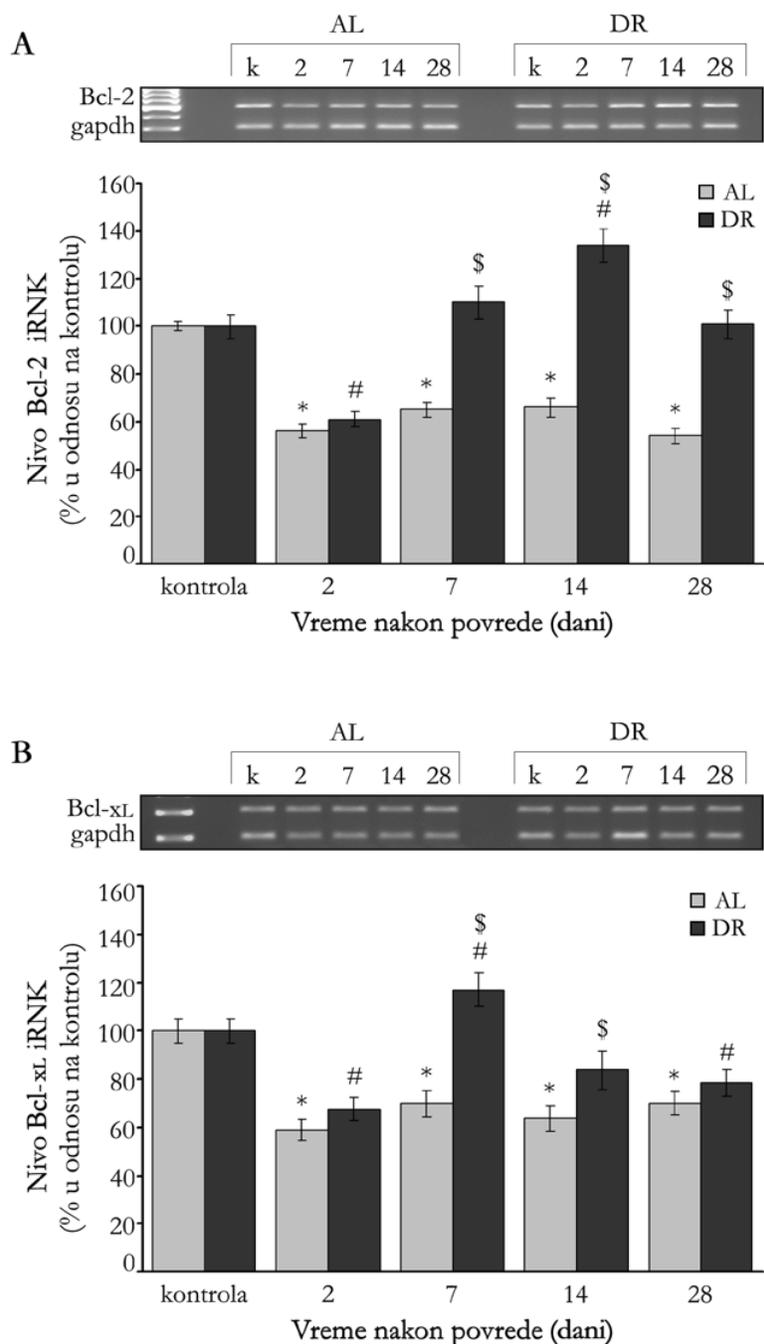
Slika 27. Promene u ekspresiji NF κ B proteina u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga AL i DR životinja nakon povrede. Western blot analiza. Relativne vrednosti nivoa NF κ B proteina su normalizovane u odnosu na ekspresiju β -aktina. Rezultati su izraženi kao procenat (%) promene u odnosu na kontrolnu vrednost (fiziološka kontrola 100%). Prikazan je reprezentativni imunoblot. * $p<0,05$ u odnosu na AL kontrolu; # $p<0,05$ u odnosu na DR kontrolu; \$ $p<0,05$ u odnosu na odgovarajuću vremensku tačku za AL.

4.9. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju iRNK za Bcl-2 i Bcl-xL u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede

U ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova RT PCR metodom je pokazano da povreda mozga utiče na ekspresiju iRNK za antiapoptotske gene Bcl-2 (Slika 28A) i Bcl-xL (Slika 28B) u obe grupe životinja (AL i DR).

Analiza rezultata (dvofaktorska ANOVA) za promene Bcl-2 iRNK ukazala je na značajan efekat faktora dijetalne restrikcije ($F(1,40)=74,247$; $p<0.05$), vremena ($F(4,40)=22,725$; $p<0.05$), kao i interakcije faktora restrikcija x vreme ($F(4,40)=15,668$; $p<0.05$). U AL grupi životinja nivo ekspresije iRNK za Bcl-2 bio je značajno snižen tokom čitavog perioda nakon lezije u poređenju sa odgovarajućom AL kontrolom ($*p<0.05$) i to za: 42% u 2. danu, 35% u 7. i 14. danu i 45% u 28. danu. U DR grupi pad u ekspresiji iRNK za Bcl-2 u 2. danu (39%) je praćen povećanjem u 14. danu (37%) nakon povrede, u poređenju sa odgovarajućom DR kontrolom ($\#p<0.05$). *Post hoc* analiza pokazala je u DR grupi značajan porast ekspresije iRNK za Bcl-2 u 7, 14. i 28. danu nakon povrede u poređenju sa odgovarajućom vremenskom tačkom za AL grupu (Slika 28A; $\$p<0.05$).

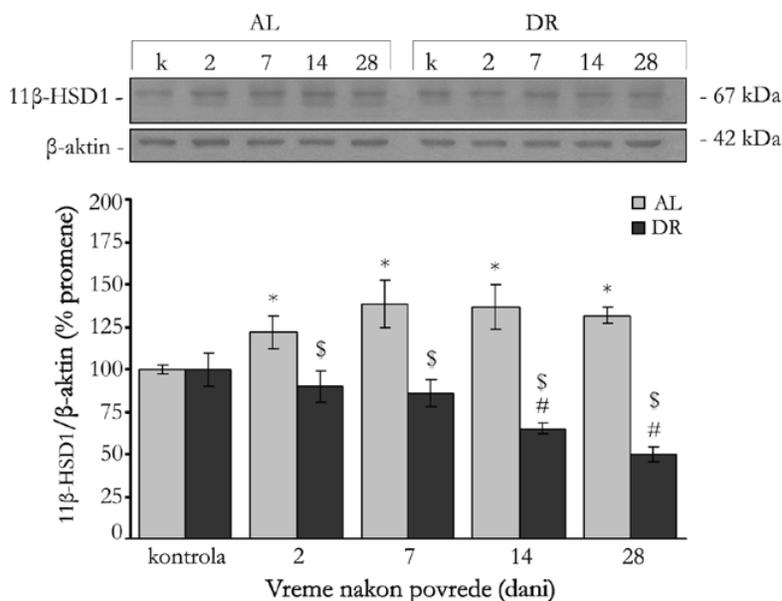
Dvofaktorska ANOVA za Bcl-xL ukazala je na značajan efekat faktora dijetalne restrikcije ($F(1,40)=28,767$; $p<0.05$), vremena ($F(4,40)=13,135$; $p<0.05$) kao i interakcije faktora restrikcija x vreme ($F(4,40)=4,093$; $p<0.05$). U AL grupi životinja ekspresija iRNK za Bcl-xL bila je značajno snižena tokom čitavog perioda nakon lezije (2.- 28. dana) u poređenju sa odgovarajućom AL kontrolom i to za: 41% u 2. danu, 32% u 7. danu, 36% u 14. danu i 31% u 28. danu nakon povrede (Slika 28B; $*p<0.05$). U DR grupi životinja, ekspresija iRNK za Bcl-xL bila je značajno snižena samo u 2. danu nakon povrede (34%), dok je u 7. danu nakon povrede bila značajno povećana (18%) u odnosu na odgovarajuću DR kontrolu (Slika 28B; $\#p<0.05$). *Post hoc* analizom utvrđen je značajan porast ekspresije iRNK za Bcl-xL u DR grupi u 7. i 14. danu nakon povrede u poređenju sa odgovarajućom vremenskom tačkom za AL grupu (Slika 28B; $\$p<0.05$). Nije uočena razlika u ekspresiji iRNK za Bcl-2 i Bcl-xL između kontrolnih AL i DR životinja.



Slika 28. Zastupljenost iRNK za Bcl-2 (A) i Bcl-XL (B) kod AL i DR životinja nakon povrede. Rezultati su dobijeni RT-PCR analizom ipsilateralne senzomotorne kore mozga AL i DR životinja, 2, 7, 14. i 28. dana nakon povrede i predstavljene kao procenat promene (srednja vrednost relativne zastupljenosti \pm standardna greška) u odnosu na vrednosti za kontrolu (FK predstavljena kao 100%). Grafiku je pridružen reprezentativni gel; * $p < 0,05$ u odnosu na AL kontrolu; # $p < 0,05$ u odnosu na DR kontrolu; \$ $p < 0,05$ u odnosu na odgovarajuću vremensku tačku za AL.

4.10. Uticaj dijetalne restrikcije na ekspresiju 11 β -HSD1 proteina u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova nakon povrede

Promene nivoa ekspresije 11 β -HSD1 proteina u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga pacova u periodu od 2. do 28. dana nakon povrede praćene su Western blot analizom (Slika 29). Dvofaktorska ANOVA pokazala je značajan efekat faktora dijetalne restrikcije ($F(1,50)=17,226$; $p<0.05$), vremena ($F(4,50)=12,784$; $p<0.05$) kao i interakcije faktora restrikcija x vreme ($F(4,50)=7,825$; $p<0.05$). Nivo ekspresije 11 β -HSD1 proteina bio je značajno povećan u AL grupi životinja u svim vremenskim tačkama i to: 22% u 2. danu, 39% u 7. danu, 37% u 14. danu i 32% u 28. danu nakon povrede u poređenju sa odgovarajućom AL kontrolom (* $p<0.05$). U DR grupi nivo ekspresije 11 β -HSD1 proteina bio je značajno smanjen za 35% u 14. danu i 50% u 28. danu nakon povrede u poređenju sa odgovarajućom DR kontrolom (# $p<0,05$). *Post hoc* analiza pokazala je značajan pad nivoa 11 β -HSD1 proteina u DR grupi u odnosu na AL grupu u svim vremenskim tačkama (\$ $p<0.05$). Nije uočena razlika u ekspresiji 11 β -HSD1 proteina između kontrolnih AL i DR životinja.



Slika 29. Promene u ekspresiji 11 β -HSD1 proteina u ipsilateralnoj kori prednjeg mozga AL i DR životinja nakon povrede. Western blot analiza. Relativne vrednosti nivoa 11 β -HSD1 proteina su normalizovane u odnosu na ekspresiju β -aktina. Rezultati su izraženi kao procenat (%) promene u odnosu na kontrolnu vrednost (fiziološka kontrola 100%). Prikazan je reprezentativni imunoblot. * $p<0,05$ u odnosu na AL kontrolu; # $p<0,05$ u odnosu na DR kontrolu; \$ $p<0,05$ u odnosu na odgovarajuću vremensku tačku za AL.

5. Diskusija

Istraživanja u oblasti oporavka nervnog sistema nakon povrede zaokupljaju pažnju naučne javnosti više od jednog veka (Ramon y Cajal, 1928). Veliki pomak je napravljen pokazivanjem da su poteškoće u regeneraciji neurona CNS-a najvećim delom posledica dejstva lokalnih procesa koji ne podržavaju i/ili onemogućavaju regeneraciju (Richardson i saradnici, 1980). Dugoročni oporavak nakon povrede mozga, koji se odvija kroz procese izrastanja neurita, sinaptičke plastičnosti i regeneracije neurona, u velikoj meri je pod uticajem molekula koji okružuju neurone u vanćelijskom prostoru. Ovaj prostor naziva se „vanćelijski matriks“ i upravo od sastava tog miljea u kome se neuroni nalaze zavisi i njihova sudbina. Naime, ukoliko se oštećeni neuroni nađu okruženi permisivnim miljeom u kome dominiraju faktori rasta – oni će regenerisati i uspostavljati nove sinapse, što će, preneto na viši nivo, omogućiti očuvanje funkcije datog regiona mozga. Ukoliko, pak, neuroni budu okruženi nepermisivnim miljeom u kome dominiraju inhibitorni molekuli – oni neće regenerisati. Nemogućnost izrastanja neurita dovodi do gubitka kontakta sa drugim neuronima u okruženju i nemogućnosti ostvarivanja sinapsi, što sve za posledicu ima odumiranje datog neurona. Posmatrano na funkcionalnom nivou, odumiranje određenog broja neurona u određenom regionu najčešće povlači za sobom i oštećenje ili gubitak određene funkcije. To zapravo znači da će od vrste molekula koji dominiraju u vanćelijskom prostoru mozga u datom trenutku, zavisiti čitav proces oporavka nakon povrede.

Iako aktivacija mikrogljivskih ćelija predstavlja sastavni deo odgovora CNS-a na povredu, još uvek nije u potpunosti razjašnjeno da li aktivirana mikroglija promoviše preživljavanje neurona ili ove ćelije dodatno povećavaju stepen oštećenja neurona. Neki rezultati ukazuju da mikrogljivske ćelije imaju pozitivan efekat na indukciju neuroplastičnih procesa nakon ishemije mozga (Madinier i saradnici, 2009). Veliki broj novijih podataka je pokazao da imunosupresivne strategije koje dovode do inhibicije mikrogljivske aktivacije, istovremeno deluju i neuroprotektivno nakon traumatske ili ishemijske povrede mozga ili kičmene moždine (Hailer, 2008). Zbog toga je veliki broj istraživanja usmeren u pravcu pronalazanja načina da se ublaži aktivacija mikrogljivskih ćelija u odgovoru na povredu CNS-a, sa ciljem da se obezbedi što bolji oporavak. Rezultati naših istraživanja su dali značajan doprinos ovakvom pristupu ukazujući da DR kao pretretman može značajno da doprinese oporavku nervnog tkiva nakon ubodne lezije, između ostalog i uticajem na morfologiju i aktivnost mikrogljivskih ćelija.

U normalnom, intaktnom CNS-u, mikroglijske ćelije se nalaze u ramifikovanom stanju, koje karakteriše izrazita razgranatost nastavaka ovih ćelija sa izraženom terciarnom i kvarternom strukturom grana (Raivich G, 2005). Kada se nalazi u ramifikovanom stanju, mikroglija predstavlja dinamičan i veoma efikasan sistem nadzora i zaštite mozga. Doslovno bilo koje patološko stanje ili oštećenje CNS-a će dovesti do aktivacije mikroglijskih ćelija i gubitka njihovog „mirujućeg“ fenotipa (Raivich G, 2005; Hailer NP, 2008). Aktivirana mikroglija igra ključnu ulogu u inflamatornom odgovoru koji traje satima i danima nakon traumatske povrede mozga.

Naša istraživanja su pokazala da iako ukupan broj mikroglijskih ćelija u neposrednoj blizini lezije značajno raste i kod AL i kod DR životinja nakon povrede, morfologija ovih ćelija se značajno razlikuje u zavisnosti od režima ishrane (Lončarević-Vasiljković i saradnici, 2012). Tako je u najranijem periodu oporavka nakon povrede kod AL životinja uočeno da mikroglijske ćelije u krajnjim stupnjevima aktivacije (ameboidna i okruglasta mikroglija) čine čak preko 80% ukupne populacije mikroglijskih ćelija. Iako u AL grupi udeo aktivirane mikroglije u ukupnoj populaciji ovih ćelija značajno opada sa vremenom oporavka, procenat aktivirane mikroglije ipak nastavlja da čini preko 20% ukupne populacije mikroglijskih ćelija. Za razliku od toga, u DR grupi procentualna zastupljenost aktivirane mikroglije tokom čitavog posmatranog perioda od 28 dana nije prešla 15% od ukupne populacije mikroglijskih ćelija. Iako je studija koju su sproveli Lee i saradnici (Lee i saradnici, 2003) pokazala da DR smanjuje proliferaciju mikroglije nakon hemijski izazvane lezije, naši rezultati su po prvi put pokazali da dijetalna restrikcija primenjena pre povrede mozga, dovodi do evidentne inhibicije mikroglioze nakon povrede. Ovaj rezultat je značajan imajući u vidu da je pokazano da su aktivacija mikroglijskih ćelija i njihovo pokretanje ka mestu povrede, a ne proliferacija, dovoljni za pokretanje procesa neurodegeneracije nakon povrede (Rogove i saradnici, 2002).

Smatra se da odgovor mikroglije nije univerzalan, već da zavisi kako od regiona tako i od vrste povrede (Carson i saradnici, 2007). Najprepoznatljivija uloga mikroglije u odbrani mozga jeste uklanjanje ćelijskog debrisa fagocitozom, što se dešava tokom infekcije, inflamacije, ishemije, prilikom traume kao i u slučaju smrti neurona (Thomas WE, 1992; Gonzales-Scarano i Baltuch, 1999; Carson MJ, 2002; Danton i Dietrich, 2003). Neki tipovi povrede mozga mogu podrazumevati remodelovanje ili čak uništavanje specifičnih regiona dendrita neurona kao odgovor na promenu aktivnosti, disfunkciju neurita ili višak neurotransmitera u vanćelijskoj sredini. Na sličan način, tokom razvića,

odstranjivanje viška ekscitatornih sinapsi štiti od nastanka epileptogene aktivnosti u mozgu adultnih životinja (Chu i saradnici, 2010). Smatra se da u adultnom CNS-u ovaj proces uklanjanja sinapsi, a u težim slučajevima patologije i remodelovanje samih neurita, verovatno predstavlja protektivni mehanizam kako bi se limitirala sekundarna neurodegeneracija (Kraft i Harry, 2011).

Iako sve uloge mikrogljiskih ćelija u aktivnosti mozga još uvek nisu u potpunosti rasvetljene, široko je prihvaćeno mišljenje da ove ćelije u velikoj meri kontrolišu procese i ishod traumatske povrede mozga (Hopkins i Rothwell, 1995; Becher i saradnici, 2000). Imajući u vidu različite regulatorne aktivnosti, kao i čitav spektar citokina i hemokina koje mikrogljiske ćelije sintetišu i oslobađaju, nije teško zamisliti obim smetnji do kojih bi došlo u funkcionisanju CNS-a ukoliko bi produkcija ovih supstanci izmakla kontroli.

Poznato je da aktivirana mikroglija igra ključnu ulogu u procesima inflamacije koji počinju svega nekoliko sati posle povrede i traju danima nakon toga. Aktivirane mikrogljiske ćelije predstavljaju glavni izvor proinflamatornih citokina u CNS-u (Hanisch UK, 2002). Pokazano je da citokini (uključujući i faktore rasta) imaju višestruke efekte na različite populacije neurona. Postoje podaci da citokini potpomažu rast i diferencijaciju neurona u kori mozga, hipokampusu, strijatumu i hipofizi u toku razvića. Iako je fiziološka uloga citokina u neurotransmisiji još u velikoj meri nerazjašnjena, poznato je da oni mogu modulirati oslobađanje neurotransmitera preko konstitutivno eksprimiranih receptorskih kompleksa (Hanisch UK, 2001a, 2001b). Pokazano je da se oslobađanje acetilholina, noradrenalina, dopamina, serotonina kao i γ -aminobuterne kiseline (GABA) menja u ćelijama pod tretmanom citokinima, kao što su interleukini, interferoni i TNF- α (Rothwell i Hopkins, 1995; Hanisch UK, 2001a, 2001b). Na ovaj način citokini sintetisani u mikrogliji mogu imati direktan uticaj na funkciju susednih neurona.

5.1. Efekat dijetalne restrikcije na procese inflamacije i neurodegeneracije nakon povrede mozga

Ukoliko mikrogljiske ćelije duže vreme ostanu aktivirane i otpuštanje citokina od strane ovih ćelija postaje obilno. Imajući u vidu da su citokini ključni posrednici inflamatornog odgovora u mozgu u patološkim stanjima (Owens i saradnici, 2005) to može dovesti do direktnog ometanja funkcija CNS-a. Na kraju, neki efekti mikroglije kao što su inhibicija proliferacije, indukcija apoptoze i toksičnost, mogu pretvoriti mikrogljiske ćelije u unutrašnji izvor potencijalno štetnih faktora (Hanisch UK, 2002). Izgleda da neki od

citokina koje nakon povrede predominantno sintetišu i luče mikroglijske ćelije, imaju kritičnu ulogu u neuropatološkim događajima u mozgu. Jedan od njih je i TNF- α koji predstavlja ključni proinflamatorni citokin (Hanisch UK, 2002; Kraft i saradnici, 2009; Kraft i Harry, 2011). I dok je dejstvo nekih citokina indirektno i svodi se na učešće u procesima imunog odgovora ili na stimulaciju produkcije slobodnih radikala u glijskim ćelijama, TNF- α može biti direktno toksičan za oligodendrocite i neurone (Hanisch UK, 2001a). Treba, međutim, naglasiti da će od nivoa ekspresije TNF- α zavistiti i njegov uticaj na ćeliju. Naime, smatra se da nizak nivo ovog citokina ima neuroprotektivno dejstvo, odnosno da može zaštititi CNS od oštećenja nastalih usled ekscitotoksičnosti, hipoksije, hipoglikemije i traumatskih povreda (Cheng i saradnici, 1994; Mattson i saradnici, 1995; Bruce i saradnici, 1996). Sa druge strane, čitav niz studija je pokazao da je visok nivo TNF- α neurotoksičan i da ima veoma štetne efekte na mozak (Shohami i saradnici, 1996; Venters i saradnici, 2000; Harry i saradnici, 2008).

Ranije studije su pokazale da se ekspresija i sekrecija TNF- α naglo povećavaju u neuronima do četvrtog sata nakon povrede, a da se to povećanje javlja kao posledica ekscitotoksičnih događaja na nivou sinapse (Bruce-Keller AJ, 1999). Pojačana sekrecija TNF- α od strane neurona dovodi do indukcije proliferacije okolnih mikroglijskih ćelija i stimuliše njihovu aktivaciju. Aktivirane mikroglijske ćelije nastavljaju da eksprimiraju TNF- α u periodu od 2. do 5. dana nakon povrede, što dovodi do održavanja i pojačavanja inflamatorne kaskade (Arvin i saradnici, 1995; Bruce-Keller AJ, 1999).

Naše studije su pokazale da se jaka indukcija TNF- α proteina javlja u kori prednjeg mozga AL životinja veoma rano, već 2. dana nakon povrede. Međutim, kod životinja koje su hranjene restriktivno, TNF- α protein nije detektovan ni u jednoj vremenskoj tački nakon povrede (Lončarević-Vasiljković i saradnici, 2012). Indukcija solubilnog TNF- α proteina se kod AL životinja vremenski poklapa sa maksimumom aktivacije mikroglijskih ćelija, Istovremeno kod DR životinja kod kojih mikroglija uglavnom zadržava morfologiju mirujuće glije, nije detektovana indukcija TNF- α proteina ni u jednoj vremenskoj tački oporavka nakon povrede. S obzirom na vremenski profil aktivacije mikroglije i indukcije solubilnog TNF- α proteina, možemo pretpostaviti da TNF- α vodi poreklo upravo od mikroglijskih ćelija. Međutim, neophodne su dodatne studije koje bi pokazale koji tip ćelija je direktno odgovoran za uočenu indukciju ovog citokina u našem modelu. Imajući u vidu da TNF- α predstavlja jedan od glavnih proinflamatornih citokina, direktno uključenih u

otpočinjanje i širenje sekundarne povrede, suprimiranje indukcije ovog citokina moglo bi voditi redukciji obima sekundarne povrede.

Poznato je da inflamatorni procesi do kojih dolazi nakon povrede, na kraju dovode do degeneracije i apoptoze neurona (Veenith i saradnici, 2009). Iako se pretpostavlja da pojačana ekspresija TNF- α proteina dovodi do pokretanja apoptotskog puta, spoljašnji signalni putevi koji dovode do apoptoze nakon povrede CNS-a još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Međutim, pokazano je da se unutarćelijski apoptotski signali koji vode do zajedničke krajnje tačke, odnosno aktivacije kaspaze-3, javljaju podjednako i u neuronima i u glijskim ćelijama nakon povrede kičmene moždine (Emery i saradnici, 1998; Hayashi i saradnici, 1998; Springer i saradnici, 1999; Beattie i saradnici, 2000; Citron i saradnici, 2000; Li i saradnici, 2000; Springer i saradnici, 2000). Slično tome, postoje brojni dokazi o aktivaciji kaspaze-3 i u drugim tipovima povrede CNS-a, uključujući i traumatsku povredu mozga, kao i ishemiju/moždani udar (Gotttron i saradnici, 1997; Hara i saradnici, 1997; Yakovlev i saradnici, 1997; Endres i saradnici, 1998; Ni i saradnici, 1998; Pike i saradnici, 1998; Velier i saradnici, 1999; Clark i saradnici, 2000; Eldadah i Faden, 2000; Shibata i saradnici, 2000; Zhu i saradnici, 2000). Brojne *in vitro* studije su pokazale da je aktivacija kaspaze-3 inicirana, barem delom, ushodnim događajima koji dovode do oslobađanja citohroma *c* iz mitohondrija (Liu i saradnici, 1996; Kluck i saradnici, 1997; Bossy-Wetzel i saradnici, 1998; Skulachev, 1998; Yang i Cortopassi 1998; Slee i saradnici, 1999). Citohrom *c* zatim stupa u interakciju sa Apaf-1 (*engl.* apoptosis protease activating factor-1) i dovodi do aktivacije kaspaze-9, koja predstavlja ushodni aktivator kaspaze-3 (Liu i saradnici, 1996; Kluck i saradnici, 1997; Skulachev, 1998; Slee i saradnici, 1999). Međutim, vremenski i prostorni obrazac pokretanja signalnih puteva koji dovode do aktivacije kaspaze-3 razlikuje se u zavisnosti od tipa i jačine povrede. U slučaju traumatske povrede mozga, aktivirana kaspaza-3 uočena je u povređenoj kori mozga u periodu od 6 do 72 sata nakon povrede (Beer i saradnici, 2000). Eksperimenti dvojnog obeležavanja pokazali su da je aktivna kaspaza-3 prisutna u neuronima, astrocitima i oligodendrocitima (Beer i saradnici, 2000). Naši rezultati su, u skladu sa pomenutom literaturom, pokazali da se jaka indukcija aktivne kaspaze-3 javlja u povređenoj kori prednjeg mozga kod AL životinja drugog dana nakon povrede. Međutim, kod životinja koje su bile na restriktivnom režimu ishrane aktivna kaspaza-3 nije detektovana (Lončarević-Vasiljković i saradnici, 2012).. Iako naši rezultati ne daju direktan podatak o tome koji tip ćelija eksprimira kaspazu-3 nakon povrede i u kojoj meri, činjenica da se indukcija kaspaze-3 u AL grupi životinja vremenski poklapa sa

masovnom degeneracijom neurona oko samog mesta povrede, navodi na pretpostavku da uočena kaspaza-3 kod AL životinja može poticati upravo iz neurona. Pored toga, studije su pokazale da je procenat neurona koji ekspimiraju aktivnu kaspazu-3 daleko veći od procenta astrocita i oligodendrocita koji ekspimiraju aktivnu kaspazu-3 u prvih 72 sata nakon povrede (Beer i saradnici, 2000).

Činjenica da se i jaka indukcija kaspaze-3 i masovna neurodegeneracija javljaju kod AL životinja 48 sati nakon povrede, navodi na pretpostavku da uočena kaspaza-3 može poticati iz neurona. Iako su neophodna dalja istraživanja kako bi se utvrdilo da li je uočena neurodegeneracija kaspazno-zavisna u prilog ovoj pretpostavci ide i činjenica da kod DR životinja kod kojih nije detektovana indukcija aktivne kaspaze-3, nisu uočeni neuroni u procesu degeneracije. S obzirom da aktivna kaspaza-3 može igrati veoma važnu ulogu u neurodegenerativnim procesima nakon traumatske povrede mozga (Beer i saradnici, 2000; Springer JE, 2002), supresija indukcije kaspaze-3 koja je uočena kod DR životinja može zaštititi neurone od apoptoze izazvane procesima sekundarne povrede. Imajući u vidu da ishod nakon povrede direktno zavisi od broja izgubljenih neurona, smrt nervnih ćelija predstavlja najveći problem povezan sa lošom prognozom nakon TBI. Upravo zbog toga, u prošlosti su razvijane mnoge strategije u pokušaju da se umani gubitak nervnih ćelija nakon povrede. Rezultati prezentovani u ovoj studiji su pokazali da DR ima neuroprotektivno dejstvo, s obzirom da je ovaj režim ishrane uspeo u potpunosti da suprimira sekundarnu neurodegeneraciju i neuroapoptozu izazvane povredom.

5.2. Efekat dijetalne restrikcije na procese plastičnosti nakon povrede mozga

Smrt neurona kao direktna posledica procesa inflamacije u okviru sekundarne povrede, predstavlja samo jedan aspekt negativnih događaja koji pogađaju nervne ćelije u periodu oporavka nakon povrede mozga. Naime, događaji koji slede nakon akutne faze inflamacije, danima i nedeljama nakon povrede, za rezultat imaju stvaranje nepermissivne sredine koja ne dozvoljava izrastanje neurita vijabilnih neurona oko samog mesta povrede. Smatra se da centralnu ulogu u ovim procesima igraju astrociti. Naši rezultati su u skladu sa literaturom koja je pokazala da je izražena aktivacija astrocita nakon povrede adultnog mozga uvek asociirana sa odsustvom regeneracije aksona (Lefrançois i saradnici, 1997). Naime, poznato je da je regenerativni kapacitet adultnog CNS-a izuzetno ograničen i da, prema preovlađujućem mišljenju, uspešna regeneracija u adultnom mozgu može zahtevati manipulisanje kako suštinskim karakteristikama samih neurona, tako i okruženja u kome se

ti neuroni nalaze (Goldberg i Barres, 2000; Cho i saradnici, 2005; Blackmore i Letourneau, 2006). Presinaptički proteini GAP-43 i SPH su usko povezani sa reorganizacijom aksona i sinaptogenezom u mozgu nakon povrede. GAP-43 direktno učestvuje u procesima rasta aksona, formiranju novih veza među neuronima, remodelovanju sinapsi, kao i grananju aksona nakon povrede, dok SPH ukazuje na promene u nivou sinapse (Masliah i saradnici, 1991; Benowitz i Routtenberg, 1997). Dosadašnji podaci koji se tiču ekspresije GAP-43 nakon povrede su kontradiktorni. Iako je široko prihvaćeno da povreda mozga izaziva prekomernu ekspresiju GAP-43, takođe postoje i podaci da ekspresija ovog proteina ostaje nepromenjena nakon povrede, pa čak i podaci da pada ispod nivoa zabeleženog u intaktnom mozgu (Elliot i saradnici, 1997; Hulsebosch i saradnici, 1998; Singh i saradnici, 2003). Naša studija je pokazala da ekspresija GAP-43 proteina pokazuje tendenciju pada u AL grupi životinja nakon povrede, dok je pretretman u vidu dijetalne restrikcije uspeo da održi ekspresiju ovog proteina na kontrolnom nivou. Razlike u ekspresiji GAP-43 proteina između AL i DR životinja su još uočljivije ukoliko se posmatra sam region oko mesta lezije. Tako se u mozgu DR životinja uočava intenzivno imunobojenje na GAP-43 oko samog mesta lezije u 7. danu nakon povrede, dok to nije slučaj kod AL životinja (Lončarević-Vasiljković i saradnici, 2009). U osnovi, naši podaci su u skladu sa studijama koje su pokazale da se GAP-43 imunoreakcija javlja u prvim danima nakon povrede, da bi se zatim u roku od 30 dana nakon povrede vratila na kontrolni nivo (Stroemer i saradnici, 1995; Hulsebosch i saradnici, 1998). Imajući u vidu da je rast neurita gotovo uvek povezan sa povećanom ekspresijom GAP-43 proteina (Hulsebosch i saradnici, 1998), bilo bi interesantno u daljim istraživanjima ispitati da li uočeni porast ekspresije ovog proteina kod DR životinja znači i da je došlo do regeneracije i grananja aksona neurona koji okružuju povredu.

Uzimajući u obzir da sama ekspresija GAP-43 proteina nije dovoljan uslov da bi došlo i do potpune funkcionalne regeneracije oštećenih aksona, očuvanje funkcija mozga direktno zavisi od sinaptogeneze nakon povrede. Rezultati dobijeni u okviru ove studije su pokazali da se, na nivou čitave ipsilateralne kore mozga, nivo ekspresije SPH i RNK i proteina nije promenio nakon povrede, niti kod AL niti kod DR životinja. Međutim, posmatrano na nivou same povrede kod DR životinja je uočeno izrazito imunobojenje na SPH neposredno oko mesta lezije (Lončarević-Vasiljković i saradnici, 2009). Dosadašnji literaturni podaci vezani za ekspresiju SPH nakon povrede su oprečni. Naime, SPH se često koristi kako bi se odredio broj nervnih završetaka tokom neuroanatomskog

remodelovanja, pri čemu se smatra da povećanje količine SPH znači povećanje broja sinapsi (Masliah i saradnici, 1991). Sa druge strane novije studije su pokazale vezu između akumulacije SPH u presinapsi i inhibicije sinaptičkog transporta, što predstavlja osnovu za nastanak disfunkcije datog regiona (Shoyo i Kibayashi, 2006). Posmatrajući naše rezultate kroz prizmu pomenute literature, povećanje SPH imunobojenja uočeno kod DR životinja oko mesta povrede može biti pokazatelj povećane sinaptičke plastičnosti u povređenom regionu, ali isto tako može ukazivati i na početak neurodegeneracije. Činjenica da se SPH imunobojenje vremenski podudara sa GAP-43 imunobojenjem, navodi na pretpostavku da je došlo do remodelovanja sinapsi u tkivu koje okružuje mesto povrede. Dobijeni rezultati ukazuju na sposobnost DR da menja plastična svojstva povređenog regiona kore mozga pacova.

5.3. Efekat dijetalne restrikcije na astroglijske ćelije nakon povrede mozga

Smatra se da astrociti obezbeđuju potporu i usmeravaju aksone pri izrastanju i pomažu u poboljšanju funkcionalnog oporavka nakon povrede CNS-a (Privat, 2003). Međutim, treba napomenuti da produžena aktivacija astrocita postaje štetna za izrastanje aksona. Hipertrofirani nastavci astrocita stvaraju gustu mrežu oko mesta povrede i oslobađaju u okolnu sredinu inhibitorne supstance, pre svega inhibitorne proteoglikane. Na ovaj način glijski ožiljak, koji pretežno formiraju reaktivni astrociti, predstavlja i fizičku i hemijsku prepreku regeneraciji aksona i njihovom ponovnom funkcionalnom povezivanju (Cafferty i saradnici, 2007; Rolls i saradnici, 2009). Rezultati naše studije su pokazali da restriktivni režim ishrane ima kapacitet da u velikoj meri suprimira morfološke promene astrocita vezane za njihovu aktivaciju. Pored toga, u poređenju sa AL životinjama, DR je u značajnoj meri suprimirala i ekspresiju inhibitornog proteoglikana neurokana u svim tačkama oporavka nakon povrede.

Veliki broj *in vitro* i *in vivo* studija je pokazao da kada se isključe geni za GFAP i vimentin dolazi do redukcije aktivacije astrocita, uz istovremeno poboljšano preživljavanje i regeneraciju neurona nakon povrede CNS-a (Pekny i saradnici, 1999; Menet i saradnici, 2003; Wilhelmsson i saradnici, 2004). Iz ovoga proizilazi da odsustvo intermedijarnih filamenata, GFAP-a i vimentina, modifikuje morfološke osobine reaktivnih astrocita onemogućavajući na taj način stvaranje glijske barijere oko mesta povrede. Studije na ćelijskoj kulturi su pokazale da je i samo odsustvo GFAP-a dovoljno za ovaj efekat (Menet i saradnici, 2000, 2001) Smatra se da je odsustvo GFAP-a u astrocitima povezano sa

biohemijskim promenama u sastavu vanćelijske sredine (Menet i saradnici, 2001), što je praćeno poboljšanjem u preživljavanju neurona, kao i boljim izrastanjem neurita nakon povrede. Pretpostavka je da osim modifikacije morfologije reaktivnih astrocita, odsustvo GFAP-a menja ravnotežu između molekula vanćelijske sredine koji pomažu regeneraciju neurita i onih koji ovaj proces onemogućavaju (Davies i saradnici 1999; Bradbury i saradnici, 2002).

Naši rezultati su pokazali da restriktivni režim ishrane, osim značajnih efekata na morfologiju astrocita ima kapacitet da značajno snizi ekspresiju GFAP proteina tokom posmatranog perioda oporavka nakon povrede kore mozga pacova (Lončarević-Vasiljković i saradnici, 2009). Imajući u vidu činjenicu da je supresija ekspresije GFAP proteina bila praćena i značajnom supresijom indukcije neurokana možemo reći da su dobijeni rezultati u skladu sa prethodno pomenutom literaturom. Pored toga, rezultati dobijeni za proteine koji učestvuju u izrastanju neurita i sinaptogenezi (GAP-43 i SPH) mogu se posmatrati kao logična posledica pomenutih efekata DR na astrocite. Naime, snižena ekspresija GFAP proteina, gubitak reaktivnog fenotipa astrocita, ali i snižena ekspresija neurokana uočena kod DR životinja korelira sa pojačanom ekspresijom GAP-43 i SPH proteina oko mesta povrede. Ovo bi moglo ukazivati na to da dijetalna restrikcija ima sposobnost da reguliše ekspresiju GFAP proteina, što za posledicu ima supresiju aktivacije astrocita i smanjeno lućenje neurokana. Pretpostavljamo da su ovi događaji značajni za stvaranje permisivne sredine u kojoj neuroni mogu pokrenuti procese regeneracije i izrastanja neurita, a zatim i sinaptogeneze, koja bi finalno mogla voditi i do boljeg funkcionalnog oporavka nakon povrede.

Postoje podaci da u odsustvu GFAP-a i vimentina, astrociti imaju morfologiju koja je karakteristična za nezrele astrocite (Gimenez y Ribotta, 2000; Menet i saradnici, 2001). U nezrelom CNS-u, aksoni mogu nesmetano regenerisati čak i kroz samo mesto lezije (Saunders i saradnici, 1995). Čini se da u osnovi ovog fenomena leži redukcija glijskog ožiljka, što u velikoj meri potpomaže stvaranju permisivne sredine za rast i regeneraciju aksona (Barrett i saradnici, 1984). Iako mehanizam kojim DR suprimira astrogliozu i redukuje stvaranje glijskog ožiljka ostaje nepoznat, na osnovu dobijenih rezultata, ali i opisane literature, možemo da napravimo paralelu između procesa koji se odvijaju u mozgu neonatalnih životinja i životinja na restriktivnom režimu ishrane. Pitanje da li je moguće da dijetalna restrikcija na neki način „vraća“ astrocite u njihovu neonatalnu formu, čineći ih potporom regeneraciji i rastu aksona, pak, ostaje izazov za naredna istraživanja.

Pored pomenutih inhibitornih proteoglikana, bitnu ulogu u inhibiciji izrastanja neurita nakon povrede igra i TNF- α . Naime, *in vitro* studije su pokazale da TNF- α , poreklom iz glijskih ćelija, osim uloge u inflamatornom odgovoru i ćelijskoj smrti, može inhibirati izduživanje i grananje neurita tokom razvića ili u toku regeneracije (Neumann i saradnici, 2002). Smatra se da TNF- α ove efekte postiže, kao i neurokan, aktivacijom male RhoA GTPaze u neuronima (Neumann i saradnici, 2002).

I pored svih nabrojanih negativnih uticaja aktiviranih glijskih ćelija na procese oporavka nakon povrede mozga, glijske ćelije su ipak neophodne za normalno funkcionisanje kako intaktnog, tako i povređenog mozga. Mikroglijske i astroglijske ćelije čak i u aktiviranom stanju sintetišu i luče trofičke faktore koji pozitivno deluju na rast i regeneraciju neurita (Shein i saradnici, 2008; Wang i saradnici, 2008; Buffo i saradnici, 2009). Studije su pokazale da je potpuno uklanjanje astrocita imalo za posledicu veće širenje povrede i veći stepen neurodegeneracije oko mesta lezije, usled nesmetanog širenja inflamatornih ćelija po okolnom tkivu (Faulkner i saradnici, 2004). Dakle, zbog mešovite prirode mikroglijskih i astroglijskih produkata (kako štetnih tako i zaštitnih faktora), sveobuhvatna uloga glijskih ćelija može varirati u različitim vremenskim tačkama nakon povrede, od veoma štetnih efekata koji preovlađuju rano (u satima i danima) do protektivnih i regenerativnih koji se dešavaju kasnije (u nedeljama) nakon povrede (Wang i saradnici, 2007). Ono što je bitno naglasiti jeste da dijetalna restrikcija nije dovela do smanjenja broja glijskih ćelija u mozgu nakon povrede, već je samo suprimirala prelazak ovih ćelija u aktivirano stanje. Naši rezultati navode na pretpostavku da je DR na neki način promenila „aktivacioni program“ glijskih ćelija nakon povrede, a sam mehanizam kojim je DR postigla ovaj efekat, ostaje predmet budućih studija.

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju daju nam pregled događaja nakon povrede kore prednjeg mozga pacova, kao i uvid u efekte koje na te događaje ima restriktivni režim ishrane. Naime, naši rezultati su pokazali da dijetalna restrikcija suprimira aktivaciju mikroglije i indukciju TNF- α , ali i indukciju kaspaze-3 i pokretanje sekundarne smrti neurona. Pored toga, dijetalna restrikcija suprimira aktivaciju astrocita i sintezu neurokana, dok sa druge strane promoviše indukciju GAP-43 i sinaptofizina, proteina uključenih u rast aksona i formiranje sinapsi.

Posmatrajući naše rezultate kroz prizmu dosadašnjih istraživanja iz oblasti, mogli bismo samo izneti hipoteze, ali ne i tvrdnje, na koji način dijetalna restrikcija menja tok događaja nakon povrede, od nepovoljnog, ka očigledno povoljnijem ishodu. Ono što

predstavlja upadljivu karakteristiku svih navedenih procesa sekundarne povrede jeste prisustvo TNF- α proteina u svakom njenom segmentu. Poznato je da TNF- α , kao jedan od glavnih proinflamatornih citokina igra veoma važnu ulogu u čitavom nizu procesa nakon povrede mozga. Naime, neuroni oštećeni u toku nastanka primarne povrede luče TNF- α i pokreću aktivaciju mikroglije, što za posledicu ima pokretanje sinteze mikroglijskog TNF- α proteina (Bruce-Keller A, 1999; Block i saradnici, 2007; McCoy i Tansey, 2008), aktivaciju astroglijskih ćelija i pokretanje sinteze astroglijskog TNF- α proteina (Munoz-Fernandez i Fresno, 1998; Neuman i saradnici, 2002; Zhang i saradnici, 2010), pokretanje unutarćelijskih mehanizama koji za krajnji ishod imaju smrt neurona (Baud i Karin, 2001; Pickering i saradnici, 2005), pokretanje sinteze inhibitornih proteoglikana u astrocitima (Asher i saradnici, 2000), ali i direktnu inhibiciju rasta neurita aktivacijom Rho GTP-aza (Neumann i saradnici, 2002). Poznato je da se novija farmakološka i klinička istraživanja u značajnoj meri usmeravaju ka traženju multifunkcionalnih agenasa koji bi delovali na različite mehanizme povrede (Stoica i saradnici, 2009). Ostaje pitanje na koji način DR dovodi do uočenih promena, odnosno da li utiče na konkretan rani događaj, blokirajući tako pokretanje čitave kaskade nishodnih događaja, ili upravo poput „multifunkcionalnog agensa“ utiče na više aspekata sekundarne povrede. Odnosno, da li je uočena supresija indukcije solubilnog TNF- α proteina uzrok ili posledica delovanja dijetalne restrikcije? Buduća istraživanja će se baviti promenama u ekspresiji enzima TACE koji dovodi do nastanka solubilnog TNF-a, kao i anti-inflamatornim citokinima (IL-4, IL-10, IL-13) koji inhibiraju nastanak solubilnog TNF-a. Do sada je pokazano da primena inhibitora TACE može da doprinese redukciji povrede mozga usled ishemije (Wang i saradnici, 2004).

5.4. Efekat dijetalne restrikcije na koncentraciju kortikosterona u serumu i uticaj ovog hormona na procese sekundarne povrede

Činjenica da se većina procesa u okviru sekundarne povrede odigrava relativno kasno (satima i danima nakon povrede) čini ih podložnim različitim terapijskim intervencijama. Klinički tretmani koji se standardno koriste u terapiji traumatske povrede mozga baziraju se na terapiji glukokortikoidima (*engl.* glucocorticoids, GC) (Gulino i saradnici, 2009; Chang i saradnici, 2009). Poznato je da GC deluju direktno na procese inflamacije, što za posledicu ima sprečavanje širenja sekundarne povrede i posledičnu neuroprotekciju (Rhodes JK., 2003). Međutim, s obzirom na čitav niz procesa u koje su GC uključeni, pored korisnih, postoje i brojni neželjeni efekti ove vrste tretmana (Chen i

saradnici, 2010; Clarner i saradnici, 2011) . Drugim rečima, apsolutno bezbedan i efikasan antiinflamatorni tretman za pacijente koji su pretrpeli traumatsku povredu mozga još uvek ne postoji.

U poslednjih petnaestak godina pojavili su se podaci da restriktivni režim ishrane u trajanju od nekoliko meseci pre povrede CNS-a ima neuroprotektivna svojstva, kao i da poboljšava funkcionalni oporavak u nekoliko modela povrede centralnog nervnog sistema (Bruce-Keller i saradnici, 1999; Sharma i Kaur, 2005, 2008; Roberge i saradnici, 2008). Pretpostavlja se da u osnovi neuroprotektivnih svojstava leži činjenica da životinje koje su podvrgnute dijetalnoj restrikciji karakteriše čitav spektar biohemijskih i fizioloških promena koje predstavljaju adaptaciju na smanjeni unos hrane. U ove adaptacije spadaju: redukcija telesnog rasta, procentualno uvećanje nadbubrežnih žlezda u odnosu na masu tela, povišena metabolička efikasnost, snižen nivo mitogeneze praćen povišenim nivoom apoptoze, smanjeni inflamatorni odgovor, indukcija proteina stresa kao i enzima zaduženih za reparaciju DNK, povišena ekspresija enzima koji učestvuju u metabolizmu lekova kao i modifikacija imunskog odgovora. Ukupni profil ovih adaptacija predstavlja jedan od bitnijih faktora koji vodi poboljšanoj odbrani organizma od raznih stresora (Frame i saradnici, 1998). Međutim, jedan od najranijih i najbolje opisanih efekata DR na organizam jeste povišena koncentracija serumskog kortikosterona (Armario i saradnici, 1987; Stewart i saradnici, 1988; Leakey i saradnici, 1991; Sabatino i saradnici, 1991; Patel i Finch, 2007, Marinkovic i saradnici, 2007). Pokazano je da stres izazvan promenama u ishrani kao što su post, izgladnjivanje ili hipoglikemija indukovana insulinom, dovodi do porasta nivoa KORT u serumu, kako kod pacova koji gladuju (Suemaru i saradnici, 1986) tako i kod onih koji su podvrgnuti samo određenom stepenu restrikcije hrane (Leal i saradnici, 1995).

Rezultati naših istraživanja su pokazali da kod DR životinja dolazi do značajnog procentualnog uvećanja težine nadbubrežnih žlezda u odnosu na ukupnu masu tela, u odnosu na isti parametar kod AL životinja, što ukazuje na pojačanu funkciju ovih žlezda. U prilog tome ide i činjenica da je kod životinja podvrgnutih dijetalnoj restrikciji došlo i do značajnog porasta koncentracije kortikosterona u serumu, u odnosu na koncentraciju ovog hormona kod AL životinja. Ovi rezultati su u skladu sa podacima iz literature koji DR definišu kao stresor koji, kao takav, neminovno dovodi do pomenutih promena nivoa KORT (Marinkovic i saradnici, 2007; Patel i Finch, 2007). Smatra se da DR upravo na taj način pokreće različite mehanizme odbrane koji povećavaju stepen neuroprotekcije (Leakey i saradnici, 1998; Sharma i Kaur, 2005). Takođe je pokazano da neuroprotektivna

moć glukokortikoida direktno zavisi od primenjene doze. Naime, visoke doze glukokortikoida značajno redukuju oštećenje tkiva mozga izazvano ishemijom, dok niske doze nemaju to dejstvo (Limbourg i Liao, 2003). Visoke doze GC stabilizuju membrane, snižavaju lipidnu peroksidaciju, i smanjuju otok i inflamaciju u mozgu nakon povrede (Hall i saradnici, 1987, Holmin i saradnici, 1997). Smatra se da je jedan od mogućih protektivnih mehanizama delovanja GC povezan sa supresijom proinflamatornih citokina (Gottesfeld i saradnici, 2002) koje, kao odgovor na povredu CNS-a predominantno sintetišu aktivirani astrociti i mikrogljijske ćelije, a u manjoj meri i makrofagi i neuroni (Taupin i saradnici, 1994; Shohami i saradnici, 1994; Fan i saradnici, 1996; Gourin i saradnici, 1997; Pulliam i saradnici, 1998; Knobloch i saradnici, 1999).

Rezultati ove studije su pokazali da DR u značajnoj meri podiže nivo kortikosterona u serumu, što bi moglo odgovarati pomenutim visokim dozama sintetičkih glukokortikoida. U prilog ovome ide i činjenica da je DR upravo poput visokih doza egzogenih GC delovala na sve ispitivane procese sekundarne povrede. Dejstvo koje je dijetalna restrikcija ispoljila nakon povrede mozga moglo bi se okarakterisati kao imunosupresivno, a pretpostavka koja se neminovno nameće jeste da povišeni nivo KORT u serumu DR životinja može imati velikog udela u uočenim efektima. Naime, brojne studije su pokazale da ukoliko se nekim agensom izazove inflamacija, nivo aktivacije mikrogljijskih ćelija će biti daleko veći ukoliko su životinjama prethodno uklonjene adrenalne žlezde, ali i da će se nivo aktivacije mikrogljijskih ćelija u značajnoj meri smanjiti ako se te životinje tretiraju glukokortikoidima (Sugama i saradnici, 2008, Hinkerohe i saradnici, 2010). Činjenica da se kod DR životinja uočava visok nivo KORT u serumu uz istovremenu supresiju aktivacije mikrogljijskih ćelija navodi na pretpostavku da upravo ove povišene koncentracije KORT stoje iza uočenog efekta. Međutim, treba pomenuti da su prethodne studije takođe pokazale i da pretretman egzogenim GC dovodi do senzitivizacije imunog odgovora i da ponovni izazov za imunski sistem, kakav je davanje lipopolisaharida, dovodi do daleko intenzivnije aktivacije mikrogljijskih ćelija nego što je to slučaj sa životinjama koje nisu bile prekondicionirane glukokortikoidima (Frank i saradnici, 2010). Pored toga, pokazano je i da izlaganje životinja jakom akutnom stresu (*engl.* inescapable tailshock stress) dovodi do istovetne senzitivizacije imunskog odgovora i posledične intenzivnije aktivacije mikrogljijskih ćelija kao odgovor na davanje lipopolisaharida (Frank i saradnici, 2012). Smatra se da se u osnovi uočenih efekata nalazi povišen nivo endogenih GC koji, kao i prekondicioniranje egzogenim GC, „pripremaju sistem“ da adekvatno

odgovori na naredni nepovoljni stimulus. Ono što međutim ostaje pitanje, jeste zbog čega stres i porast kortikosterona izazvani dijetalnom restrikcijom odstupaju od pomenutog mehanizma? Ono što značajno razlikuje DR od prekondicioniranja u pomenutim studijama jeste činjenica da se u našem modelu nije radilo o jednom, akutnom davanju GC ili akutnom jakom stresiranju životinja. Životinje koje su podvrgnute dijetalnoj restrikciji se nalaze u stanju umerenog hroničnog stresa, na šta ukazuje i značajno povišen nivo KORT u serumu kontrolnih životinja. Postavlja se pitanje da li je moguće da je organizam usled dugotrajne izloženosti stresu uspostavio neku novu homeostazu u kojoj dugotrajno povišen nivo KORT umesto senzitivizacije imunskog odgovora, dovodi do njegove desenzitivizacije? Odnosno, da nakon novog nepovoljnog stimulusa, što je u našem slučaju povreda mozga, umesto pojačane aktivacije mikroglialskih ćelija i propagacije inflamacije dođe do supresije ovih događaja.

Pored uticaja na mikroglialne ćelije, pokazano je da glukokortikoidi dovode i do inhibicije transkripcije GFAP gena i do smanjenja nivoa GFAP proteina u astrocitima (Nichols i saradnici, 1990, Rozovsky i saradnici, 1995, Avola i saradnici, 2004, Liu i saradnici, 2008), ali i do supresije aktivacije astrocita nakon povrede tkiva mozga (Spataro i saradnici, 2005). Takođe, pokazano je i da sintetički GC veoma uspešno inhibiraju ekspresiju inhibitornog proteoglikana neurokana nakon povrede kičmene moždine (Brambilla i saradnici, 2005, Liu i saradnici, 2008). Imajući u vidu da su visoke koncentracije KORT kod DR životinja praćene smanjenjem ekspresije GFAP proteina, supresijom aktivacije astrocita, ali i drastičnim smanjenjem ekspresije neurokana nakon povrede mozga, možemo pretpostaviti da se u osnovi uočenih efekata kod DR životinja nalazi povišena koncentracija KORT u serumu ovih životinja.

Pored direktne supresije aktivacije glialskih ćelija, glukokortikoidi imaju sposobnost da suprimiraju i indukciju proinflamatornih citokina koje ove glialne ćelije pojačano ekspresiraju nakon povrede. Naime, pokazano je da sintetički GC uspešno inhibiraju ekspresiju TNF- α *in vitro* (Graber i saradnici, 2012) i *in vivo* u modelu povrede kičmene moždine (Xu i saradnici, 1998). Činjenica da je pojačana ekspresija proinflamatornih citokina odgovorna za širenje inflamacije i povećanje stepena sekundarne ćelijske smrti nakon povrede (Sandhir i saradnici, 2004) navodi na zaključak da supresija indukcije ovih molekula od strane GC može doprineti boljem oporavku nakon povrede mozga (He i saradnici, 2004). Pokazano je da se endogena regulacija ćelijske smrti izazvane TNF- α proteinom može postići pomoću GC (Meßmer i saradnici, 1999). Ovo je u skladu sa

brojnim studijama koje su pokazale da GC suprimiraju aktivaciju kaspaze-3 (Irazuzta i saradnici, 2005; Cubilla i saradnici, 2012) i apoptozu izazvanu proinflamatornim citokinima u različitim tipovima ćelija (Wen i saradnici, 1997; Yazawa i saradnici, 2001; Stojadinovic i saradnici, 2006; McColl i saradnici, 2007). Kako u mozgu DR životinja nije uočena indukcija TNF- α proteina i aktivne kaspaze-3, kao ni sekundarna neurodegeneracija ni smrt neurona nakon povrede, možemo pretpostaviti da visoke koncentracije KORT izmerene u serumu DR životinja mogu biti odgovorne za modulaciju procesa inflamacije i sekundarne povrede.

Neuroprotektivnim efektima DR pored nabrojanih mogu doprinositi i drugi mehanizmi . Brojni podaci iz literature pokazuju da hiperglikemija povećava, dok hipoglikemija smanjuje neurotoksičnost izazvanu kainičnom kiselinom u eksperimentalnom modelu hemijske povrede mozga (Johansen i Diemer, 1986). Takođe, brojne kliničke studije iznose značaj koncentracije glukoze u krvi kod pacijenata sa traumatskom povredom mozga, jer je ustanovljeno da održavanje koncentracije glukoze na donjoj fiziološkoj granici dovodi do smanjenja sekundarne povrede i boljeg funkcionalnog oporavka posle povrede (Schirmer-Mikalsen i saradnici, 2007; Sharma i saradnici, 2009). Postoje brojni podaci koji ukazuju na to da DR generalno snižava koncentraciju glukoze u krvi i serumu (Leakey i saradnici, 1991; Masoro i saradnici, 1992; Anson i saradnici, 2003), kao i da snižen metabolizam glukoze može doprinositi neuroprotektivnim efektima dijetalne restrikcije (Lee i saradnici, 1999; Anson i saradnici, 2003). Sa druge strane, ni preterana redukcija koncentracije glukoze u krvi nije poželjna, jer može dovesti do ozbiljnih oštećenja neurona, kako kod neonatalnih tako i kod adultnih životinja (Ennisa i saradnici, 2008). Naši rezultati pokazuju da DR u trajanju od 3 meseca dovodi do malog, ali značajnog pada koncentracije glukoze u serumu. Važno je naglasiti da se i pored značajnog sniženja, nivo glukoze u serumu DR životinja nakon 3 meseca dijetne nalazio u nivou normoglikemijskih vrednosti, odnosno DR životinje nisu bile hipoglikemične. Prethodna istraživanja sprovedena u našoj laboratoriji su pokazala da se kod životinja na kratkotrajnoj dijetalnoj restrikciji javlja hipoglikemija kao odgovor organizma na smanjeni unos hrane (Marinković i saradnici, 2007). Poznato je da sama pojava hipoglikemije predstavlja stres za organizam, što dovodi do rasta koncentracije KORT u serumu. Povišeni nivo KORT u serumu deluje tako što inhibira transport glukoze u periferna tkiva, istovremeno povećavajući nivo glukoneogeneze, kao i oslobađanje glukoze iz jetre, što zajedno za posledicu ima porast koncentracije glukoze u krvi (Frame i saradnici 1998). Ovim finim

metaboličkim mehanizmom životinje koje su podvrgnute DR uspevaju da ostanu normoglikemične, tj. da održe koncentraciju glukoze u krvi u granicama normale. Ovo ukazuje na činjenicu da DR pokreće izuzetno kompleksne mehanizme regulacije nivoa glukoze u krvi. Sa jedne strane redukcija unosa hrane *per se* obara nivo glukoze u serumu, dok sa druge dovodi do porasta nivoa KORT koji zatim dovodi do porasta produkcije glukoze. Moguće je da na ovaj način DR uspostavlja neku novu homeostazu i tako štiti organizam od štetnih efekata kako hiperglikemije, tako i hipoglikemije. Isto tako, moguće je da to umereno smanjenje nivoa glukoze u serumu DR životinja delimično doprinosi boljem oporavku ovih životinja nakon povrede.

Kao što je već pomenuto, postoje brojni podaci o kliničkoj upotrebi sintetičkih steroidnih hormona kao terapije izbora posle traumatske povrede mozga (Alderson i Roberts, 2005). Sa jedne strane, ovakav vid terapije je veoma koristan jer je pokazano da smanjuje otok moždanog tkiva, sprečava nastanak hematoma i suprimira inflamaciju (Rhodes JK., 2003). Međutim, ova terapija se sa druge strane pokazala i kao štetna, jer inhibira rast i regeneraciju oštećenih neurona posle povrede, suprimirajući ekspresiju gena plastičnosti kao što je GAP-43 (González Denisellea i saradnici, 1999). Rezultati ove studije su pokazali da i pored značajno povišenog KORT u serumu DR životinja u poređenju sa AL životinjama, do ekspresije gena plastičnosti GAP-43 i SPH, oko mesta povrede, dolazi samo u DR grupi životinja. Imajući u vidu pomenutu literaturu, rezultati dobijeni u okviru naše studije mogli bi se učiniti kontradiktornim. Međutim, pokazano je da su procesi izrastanja neurita prirodna posledica stresa izazvanog restrikcijom hrane (Leakey i saradnici, 1998), jer osim povišenih koncentracija KORT, restrikcija hrane pokreće mnoge protektivne mehanizme koji dovode do boljeg oporavka posle povrede mozga. Jedan od primera fine metaboličke regulacije, do koje dovodi DR, jeste i bimodalni uticaj povišenih koncentracija KORT i neurotrofina na ekspresiju GAP-43 (Federoff i saradnici, 1988). Pokazano je da se ekspresija GAP-43 nalazi pod pozitivnom i negativnom kontrolom; pozitivnom od strane neurotrofičkih faktora, a negativnom od strane KORT. Povišena ekspresija neurotrofina u DR ima sposobnost da dovede do pojačane ekspresije GAP-43 gena 'nadjlašavajući' na taj način efekat povišenog KORT (Federoff i saradnici, 1988). Smatra se da je u osnovi neuroprotektivnih svojstava DR upravo pojačana ekspresija neurotrofičkih faktora i proteina stresa (*engl.* heat shock proteins, Hsp), koji potpomažu preživljavanje neurona, kako u procesu starenja (Patel i Finch, 2007), tako u oporavku posle povrede (Sharma i Kaur, 2005). Takođe, važno je napomenuti da su dosadašnji

rezultati koji se tiču efekata glukokortikoida na CNS nakon povrede uglavnom dobijeni korišćenjem sintetičkih GC, a da je isto tako pokazano da se njihovi efekti ipak u izvesnoj meri razlikuju od efekata endogenih GC na mozak,

Glukokortikoidi svoje efekte ispoljavaju preko dva tipa receptora: Tip I - mineralokortikoidnog (MR) i Tip II - glukokortikoidnog (GR) receptora. Iako predominantno vezuje mineralokortikoide, MR ima 10 puta veći afinitet za KORT nego GR. Tako je pri niskim koncentracijama KORT-a (<1,5 µg/100ml) saturisano čak 80% MR, a samo oko 10% GR (Reul i De Kloet, 1985) ili već nekako lepše reći. Nasuprot tome, GR formira kompleks sa ligandom u značajnijoj meri tek u uslovima visokih koncentracija KORT u serumu (>5-10 µg/100ml). Ove koncentracije KORT u serumu karakteristične su za stanje stresa (Reul i De Kloet, 1985). Imajući u vidu da sama dijetalna restrikcija u trajanju od 3 meseca značajno povećava nivo KORT (6,6 puta) u odnosu na koncentraciju izmerenu kod AL kontrolnih životinja, a da povreda samo dodatno povećava koncentraciju KORT u serumu životinja, možemo pretpostaviti da u našem modelu KORT najveći deo svojih efekata ostvaruje upravo preko GR receptora.

Rezultati naših istraživanja pokazuju da i pored tako značajnog povećanja KORT u serumu DR životinja ne postoji značajna razlika u ekspresiji ukupnog GR receptora između AL i DR grupe životinja, kako u fiziološkim uslovima, tako ni nakon povrede. Imajući u vidu da je količina GR receptora prilično konstantna i tkivno je, odnosno ćelijski specifična, promena količine ovog receptora u tkivu mogla bi ukazivati na pojavu patologije. Činjenica da se ukupni GR ne menja ni kod AL ni kod DR grupe životinja govori u prilog očuvanosti sistema. U prisustvu hormona GR receptor biva fosforilisan što dovodi do funkcionalnih promena ovog receptora uključujući aktivaciju transkripcije, povećanje stabilnosti, promenu ćelijske lokalizacije i pospešivanje njegove ponovne upotrebe (Ismaili i Garabedian, 2004). Rezultati ove studije su pokazali da iako je nivo KORT u serumu kontrolnih životinja iz DR grupe značajno veći nego što je to slučaj sa kontrolnim AL životinjama, nije bilo razlika u nivoima fosforilacije GR receptora u tkivu kore prednjeg mozga ove dve grupe životinja. Međutim, kortikalna lezija kao dodatni, akutni stimulus, izaziva značajno višu stopu fosforilacije ovog receptora u DR grupi životinja u odnosu na AL životinje. Podaci o stepenu fosforilacije ovog receptora mogu ukazivati i na razlike u aktivnosti ovog receptora između AL i DR grupe životinja, međutim, neophodni su dodatni eksperimenti koji bi to potvrdili. Takođe, s obzirom da je u našem eksperimentu praćena fosforilacija samo na poziciji 211 (Ser 211) ostaje da se

utvrdi da li dolazi do fosforilacije i drugih mesta na GR, kao i da li se obrazac fosforilacije i zastupljenost različitih fosfo-izoforni GR receptora razlikuje između AL i DR grupe životinja. Ovo je značajno s obzirom da fosforilacija istog proteina, ali na različitim mestima, rezultuje potpuno različitim regulatornim funkcijama tog proteina (Appella i Anderson, 2000). U jedru se različite GR fosfo-izoforme vezuju za DNK i regulišu gensku ekspresiju putem interakcije sa različitim proteinima koaktivatorima (Ismaili i Garabedian, 2004). Postoji mogućnost da DR menja obrazac fosforilacije GR i na taj način pokreće potpuno drugačiji odgovor na akutna stanja, kao što je npr. traumatska povreda mozga, aktivirajući različite gene, ili čak iste gene, ali u različitoj meri. Međutim, neophodna su dalja istraživanja koja bi ispitala zastupljenost različitih izoforni u različitim tipovima ćelija u mozgu, kao i njihovu transkripcionu aktivnost.

Iako je GR transkripcioni faktor koji direktno reguliše transkripciju izuzetno velikog broja gena i na taj način utiče na sudbinu ćelije, kako u fiziološkim, tako i u patološkim stanjima, i NF- κ B kao transkripcioni faktor zajedno sa GR-om pravi finu ravnotežu od koje zavisi funkcionisanje svake ćelije. Nakon povrede, ekspresija NF-kB-regulisanih gena je veoma aktivna, što za posledicu ima kako protektivne tako i štetne efekte na oporavak CNS-a nakon povrede. Naime, NF- κ B je direktno odgovoran za regulaciju inflamatornog odgovora i apoptoze (Meffert i Baltimore, 2005). Ovaj transkripcioni faktor pokreće ekspresiju većine proinflamatornih citokina u mozgu (O'Neill i Kaltschmidt, 1997; Kulms i Schwarz, 2006). Sa druge strane, aktivirani NF- κ B (p65 subjednica) ima neuroprotektivnu funkciju preko ekspresije antiapoptotskih gena (Pöppelmann i saradnici, 2005). Takođe, NF-kB aktivno učestvuje u procesima prekonicioniranja, koji dovode do neuroprotekcije. Naime, pokazano je da aktivnost NF-kB doprinosi preživljavanju neurona i štiti nervni sistem od različitih stresnih stanja (Mattson MP, 1997; Pöppelmann i saradnici, 2005). Ekspresija mnogih NF-kB zavisnih gena može biti regulisana i transrepresijom.. Tako glukokortikoidi imaju sposobnost da ometaju, pa čak i da spreče, transkripciju proinflamatornih gena, uključujući interleukine (IL-1 β , IL-4, IL-5 i IL-8), hemokine i citokine (TNF- α) (Newton R, 2000). Smatra se da GC većinu svojih protektivnih efekata ostvaruju upravo na ovaj način. Ono što čini situaciju još kompleksnijom jeste činjenica da transkripciona aktivacija NF-kB nije univerzalno dobar ili loš događaj, već ishod aktivacije ovog transkripcionog faktora direktno zavisi od toga u kojoj ćeliji se aktivacija događa.

Generalno, smatra se da aktivacija NF- κ B u neuronima štiti ove ćelije od degeneracije, dok aktivacija NF- κ B u mikroglijskim ćelijama dovodi do pojačane ekspresije proinflamatornih citokina, što za posledicu ima degeneraciju okolnih neurona (Mattson i Camandola, 2001). Takođe, većina procesa koji se dešavaju u astrocitima nakon povrede regulisani su NF- κ B transkripcionim faktorom (O'Neill i saradnici, 1997). Smatra se da upravo aktivacija NF- κ B u astrocitima dovodi do svih opisanih negativnih promena u ovim ćelijama, što na kraju rezultuje patološkim promenama u CNS-u nakon povrede (Bethea i saradnici, 1999, Siren i saradnici, 2001). Pokazano je da inhibicija NF- κ B u astrocitima u modelu povrede kičmene moždine dovodi do supresije aktivacije ovih ćelija, smanjenja površine povređenog regiona, supresije ekspresije inhibitornih proteoglikana i boljeg funkcionalnog oporavaka (Acarin i saradnici, 2001, Brambilla i saradnici, 2009). Naši rezultati su pokazali da je kod životinja koje su bile podvrgnute dijetalnoj restrikciji ekspresija aktivne subjedinice NF- κ B (p65) značajno povećana u svim tačkama oporavka nakon povrede u odnosu na kontrolne vrednosti. Takođe, kod ovih životinja nije došlo ni do indukcije TNF- α proteina ni do pokretanja apoptoze. U odnosu na postojeće podatke u literaturi postoji više mogućih hipoteza koje bi se mogle izvesti iz dobijenih rezultata. Najpre, moguće je da se uočeni porast aktivacije NF- κ B kod DR životinja događa samo u neuronima i da to za posledicu ima neuroprotekciju. Druga mogućnost je da aktivirani GR receptor u jedru putem transrepresije blokira NF- κ B transkripcionu aktivnost, te uočeno povećanje aktivne NF- κ B subjedinice na kraju ne rezultuje povišenom ekspresijom proinflamatornih gena. Pored pomenutih mogućih mehanizama, poznato je da i GR i NF- κ B ispoljavaju antiapoptotski efekat tako što modulišu ključne regulatore unutrašnjeg apoptotskog puta, gene preživljavanja: *Bcl-2* i *Bcl-xL* u ćelijski-zavisnom maniru (Bailly-Maitre i saradnici, 2001). Glukokortikoidi su najčešće odgovorni za povećanje unutarćelijskog nivoa antiapoptotskog proteina *Bcl-2* (Sasson i saradnici 2001), dok aktivirani NF- κ B (p65 subjedinica) ispoljava svoju neuroprotektivnu ulogu povećavajući nivo antiapoptotskog *Bcl-xL* proteina (Almeida i saradnici, 2000; Simpson i Morris, 2000; Kucharczak i saradnici, 2003). Postoji mogućnost da DR preko nekog od ovih mehanizama ostvaruje svoje efekte, ali je isto tako moguće da je u pitanju skup svih pomenutih mehanizama istovremeno.

Imajući u vidu sve iznete pretpostavke, ali i pomenutu literaturu, ono što je izuzetno interesantno jesu događaji u 2. danu nakon povrede. Naime, u ovoj vremenskoj tački ne uočavaju se značajne razlike u ekspresiji p-GR (Ser211), NF- κ B (p65) i *Bcl-2* i *Bcl-*

α L između AL i DR životinja, što je izuzetno neobično s obzirom na drastično različite rezultate dobijene za TNF- α , kaspazu-3 i neurodegeneraciju između ove dve grupe životinja u pomenutoj vremenskoj tački. Drugim rečima, istovetni profil aktivacije dva transkripciona faktora direktno uključenih u regulaciju inflamacije i apoptoze i isti nivo ekspresije gena koje oni regulišu kod AL životinja biće praćen indukcijom inflamacije i neurodegeneracije, dok će kod DR životinja ovi događaji nakon povrede izostati. Upravo ovakva slika navodi na pretpostavku da se iza uočenih efekata krije daleko kompleksniji mehanizam regulacije pomenutih procesa, koji očigledno prevazilazi okvire transkripcione regulacije pomoću GR-a i NF- κ B-a.

Tokom diskusije rezultata prikazanih u okviru ovog istraživanja najčešće smo se pozivali na rezultate dobijene iz studija u kojima su korišćeni sintetički GC. Ovo je razumljivo s obzirom da se sintetički GC nalaze u kliničkoj primeni i da shodno tome o njima ima puno podataka. Pored toga i sintetički i endogeni GC ostvaruju svoje efekte na isti način, a to je preko GR receptora, te se smatra da je i odgovor organizma na oba pomenuta tipa glukokortikoida u velikoj meri sličan. Međutim, iz naših rezultata može se videti da povišene koncentracije KORT koje se javljaju u DR nisu uvek u skladu sa rezultatima opisanim za sintetičke GC. Naime, primećeno je da hronično aplikovani sintetički GC ne ispoljavaju protektivni efekat koji se može uočiti u slučaju povišenih koncentracija endogenog KORT, kod životinja na restrikciji. Nekoliko faktora razlikuje stres izazvan dijetalnom restrikcijom od drugih stresora ili terapije glukokortikoidima (Leakey i saradnici, 1998). Najpre, za razliku od tretmana farmakološkim dozama sintetičkih GC, povišena koncentracija KORT kao odgovor na stres izazvan pomoću DR uključuje prirodne GC. Odnosno, činjenica je da iako oba tipa GC svoje efekte ostvaruju preko istog receptora, sintetički GC za razliku od endogenih, ne podležu regulaciji u organizmu. Odnosno, ćelije ciljnih tkiva će 'prepoznati' endogeni hormon, a ukoliko se on nađe u previsokim koncentracijama koje bi mogle oštetiti ćeliju, biće pokrenuti mehanizmi u tkivu kako bi se potencijalno štetni efekat neutralisao. Sa druge strane, kada je reč o sintetičkim GC, njih sistem ne 'prepoznaje' i neće reagovati čak ni ako se u tkivu nađu koncentracije koje mogu imati poguban efekat na ćelije. Ako se na to još doda činjenica da su se niske doze sintetičkih GC pokazale kao neefikasne i da se u lečenju pacijenata koriste isključivo visoke doze ovih hormona, postaje jasno zbog čega je ova terapija često praćena i nizom nuspojava. Naime, za razliku od sintetičkih, efekti prirodnih GC su posredovani proteinskim KORT nosačima i 11- β hidrosisteroid dehidrogenazama (11- β HSD) koji

delujući kao puferski sistem, štite tkivo od ekstremno visokih koncentracija ovih hormona (Leakey i saradnici, 1998; Breuner i Orchinik, 2002). Takođe, za razliku od sintetičkih steroida kao što je deksametazon, endogeni KORT se vezuje za oba tipa receptora, što dovodi do usklađivanja metaboličkog odgovora na povišeni nivo ovog hormona tako da odgovor MR nije inhibiran usled pojačanog odgovora GR (Reul i saradnici, 1987).

Kortikosteron se metaboliše pomoću enzima 11- β hidrosisteroid dehidrogenaza (11- β HSD), koji se sastoji od dva enzima: 11- β HSD1 i 11- β HSD2 koji modifikuju delovanje KORT u tkivno-specifičnom maniru. Enzim 11- β HSD1 povećava, dok 11- β HSD2 obara lokalne koncentracije biološki aktivnog KORT u određenom tkivu. Enzim 11- β HSD1 karakteriše nizak afinitet za supstrat, ali istovremeno i visok kapacitet. Njegova distribucija vezana je uglavnom za metabolički aktivna tkiva u organizmu, kao što su jetra, adipozno tkivo, kosti i mozak (Moisan i saradnici 1990; Seckl JR, 1997). Pokazano je da je 11- β HSD1 veoma snažan regulator intracelularne koncentracije KORT i odlučujući faktor njegovog dejstva (Seckl i Walker, 2004). Naši rezultati su pokazali da DR u trajanju od 3 meseca značajno obara nivo 11- β HSD1 u povređenoj kori prednjeg mozga pacova, što je u skladu sa literaturnim podacima koji su pokazali da stres sam po sebi reguliše ekspresiju 11- β HSD1 u vremenski- i tkivno-zavisnom maniru (Jamieson i saradnici, 1997). Dok kratkotrajni stresori ili tretman glukokortikoidima (2-10 dana) dovode do porasta ekspresije 11- β HSD1 u hipokampusu (Low i saradnici, 1994), dugotrajniji stresori (1 mesec) dovode do smanjenja ekspresije ovog enzima (Jamieson i saradnici, 1997; Seckl JR, 1997). Ovi podaci ukazuju na to da porast aktivnosti 11- β HSD1, kao odgovor na akutni stres, predstavlja kompenzatorni mehanizam kojim se pojačava signal negativne povratne sprege kako bi se 'isključila' HPA osa. Sa druge strane, smanjenje aktivnosti 11- β HSD1 u modelima hroničnog stresa predstavlja protektivni odgovor organizma koji se bazira na ublažavanju štetnih efekata prekomerne količine glukokortikoida u tkivu (Pelletier i saradnici, 2007). Imajući u vidu da visoke koncentracije KORT izazivaju neurodegeneraciju, lokalna regulacija nivoa KORT u tkivu mozga može biti neuroprotektivna. U literaturi je opisan glukokortikoidni paradoks dijetalne restrikcije prema kome životinje na restriktivnom režimu ishrane, iako imaju značajno povišen nivo KORT u krvi, ipak ne pokazuju znake neurodegeneracije (Patel i Finch, 2002). Moguće je da uočeno značajno sniženje 11- β HSD1 proteina u tkivu mozga DR životinja ima ulogu svojevrsnog puferskog sistema koji štiti tkivo od previsokih koncentracija KORT u serumu. Sa druge strane, činjenica da je kod DR životinja došlo do supresije inflamacije

govori u prilog tome da je nivo KORT u tkivu mozga ipak bio dovoljno povišen da moduliše procese sekundarne povrede. Možemo pretpostaviti da upravo ova fina regulacija nivoa KORT u povređenom regionu mozga leži u osnovi pozitivnih efekata KORT na oporavak DR životinja.

* * *

Neuroprotekcija predstavlja važnu strategiju za tretman TBI. Iako je urađen veliki broj kliničkih studija, do danas nije identifikovan ni jedan efikasan neuroprotektivni agens. U osnovi razočaravajućih rezultata kliničkih istraživanja može biti i činjenica da u okviru tretmana pacijenata postoji velika varijabilnost, ali i da je populacija pacijenata sa traumatskom povredom mozga izuzetno heterogena. Još jedan veoma važan aspekt je i taj da većina kliničkih strategija koristi medikamente koji deluju na samo jedan patofiziološki mehanizam, iako je poznato da je u nastanak i razvoj sekundarne povrede uključen veliki broj mehanizama. Novija istraživanja se u značajnoj meri okreću ka traženju multifunkcionalnih agenasa koji bi delovali na različite mehanizme povrede, posebno na one koji se dešavaju kasnije nakon TBI (Stoica i saradnici, 2009). Delovanje na veći broj mehanizama koji doprinose pokretanju i održavanju kaskade sekundarne povrede, moglo bi poboljšati uspešnost kliničkih tretmana i dovesti do boljeg oporavka pacijenata nakon povrede mozga. Rezultati ove studije su pokazali da režim ishrane sa smanjenim unosom hrane može da ima izrazito pozitivan uticaj na sve aspekte i faze oporavka nakon traumatske povrede mozga. U svetlu prikazanih rezultata može se zaključiti da ovakav režim ishrane predstavlja preventivni terapijski pristup, bez štetnih nuspojava koje su karakteristične za terapijske koji se standardno koriste za lečenje pacijenata nakon povrede mozga.

6. Zaključci

Rezultati ove studije o efektima dijetalne restrikcije na procese oporavka nakon povrede kore prednjeg mozga pacova su pokazali da primenjeni režim ishrane dovodi do supresije inflamacije i sekundarne neurodegeneracije kao i da promovira procese plastičnosti u povređenom regionu. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Dijetalna restrikcija dovodi do porasta težine nadbubrežne žlezde, kao i do izrazitog povećanja koncentracije kortikosterona u serumu DR životinja. Sa druge strane, došlo je do značajnog smanjenja nivoa glukoze u serumu DR životinja, ali bez izlaska iz opsega normoglikemijskih vrednosti.
2. Dijetalna restrikcija suzbija indukciju TNF- α proteina, ključnog proinflamatornog citokina u povređenom regionu kore prednjeg mozga pacova, tokom čitavog posmatranog perioda oporavka.
3. Dijetalna restrikcija deluje neuroprotektivno tako što u potpunosti suprimira povredom izazvanu indukciju aktivne kaspaze-3, kao i sekundarnu neurodegeneraciju u povređenom tkivu kore prednjeg mozga pacova.
4. DR dovodi do povećanja ekspresije proteina sinaptičke plastičnosti GAP-43 i SPH oko samog mesta povrede.
5. Povećanje plastičnosti praćeno je smanjenom aktivacijom astroglijskih ćelija i smanjenjem lučenja neurokana, glavnog inhibitornog proteoglikana ovih ćelija u povređenom regionu kore prednjeg mozga pacova tokom čitavog perioda oporavka.
6. Dijetalna restrikcija dovodi do promena u prenosu signala pokrenutog kortikosteronom, preko promene zastupljenosti pGR-a, kao i značajnog smanjenja zastupljenosti 11 β -HSD1 proteina na nivou ipsilateralne kore prednjeg mozga pacova.
7. Dijetalna restrikcija dovodi do značajnog povećanja zastupljenosti p65 subjedinice transkripcionog faktora NF- κ B, ali i do promena u zastupljenosti iRNK za antiapoptotske gene *Bcl-2* i *Bcl-xL* koje reguliše NF- κ B.

Rezultati ove studije su pokazali da dijetalna restrikcija ima kapacitet da u značajnoj mjeri oblikuje odgovor povređenog tkiva mozga direktnim uticajem na procese sekundarne povrede, ali i plastičnosti. Činjenica da DR ima sposobnost da izmeni procese koji predstavljaju odgovor mozga na povredu, govori u prilog tome da bi dijetalna restrikcija mogla naći svoju primenu i u kliničkoj praksi.

7. Literatura

- Acarin, L., B. Gonzalez, and B. Castellano. 2001. Triflusal posttreatment inhibits glial nuclear factor- κ B, downregulates the glial response, and is neuroprotective in an excitotoxic injury model in postnatal brain. *Stroke*. 32:2394–2402.
- Alderson P, Roberts I. (2005) Corticosteroids for acute traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev*.(1):CD000196
- Almeida OF, Condé GL, Crochemore C, Demeneix BA, Fischer D, Hassan AH, Meyer M, Holsboer F, Michaelidis TMSubtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB J*. 14(5):779-790.
- Amsterdam A, Sasson R (2002) The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis. *Mol Cell Endocrinol*. 189(1-2):1-9.
- Amsterdam A, Tajima K, Sasson R (2002) Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochem Pharmacol*. 64(5-6):843-850.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64: 5245-5250.
- Andrew DK, HarryJG (2011) Features of Microglia and Neuroinflammation Relevant to Environmental Exposure and Neurotoxicity. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8: 2980-3018. *Ann. Nutr. Metab*. 31: 81-87.
- Anson M.R., Guo Z, de Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, Ingram D, Lane M.A., Mattson M.P. (2003) Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism i neuronal resistance to injury from calorie intake. *PNAS* 100:6216-6220.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neuroscience* 22 (5): 208–215.
- Araujo FG, Slifer TL, Remington JS (2002) Inhibition of secretion of interleukin-1alpha and tumor necrosis factor alpha by the ketolide antibiotic telithromycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 46(10):3327-3330.
- Armario A, Montero J.L, Jolin T (1987) Chronic food restriction and the circadian rhythms of pituitary-adrenal hormones, growth hormone and thyroidstimulating hormone. *Endocrinology* 23(4): 45-53.
- Armstrong R. C., Aja T. J., Hoang K. D., Gaur S., Bai X., Alnemri E. S., Litwack G., Karanewsky D. S., Fritz L. C., and Tomaselli K. J. (1997) Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. *J. Neurosci*. 17:553–562.
- Arvin B, Neville LF, Barone FC, Feuerstein GZ (1995) Brain injury and inflammation. A putative role of TNF alpha. *Ann N Y Acad Sci*. 15:765:62-71.
- Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braistead JE, Levine JM, Margolis RU, Rogers JH, Fawcett JW (2000). Neurocan is upregulated in the injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *Journal of Neuroscience*; 20(7): 2427.

- Avola R, Di Tullio MA, Fisichella A, Tayebati SK, Tomassoni D (2004) Glial fibrillary acidic protein and vimentin expression is regulated by glucocorticoids and neurotrophic factors in primary rat astroglial cultures. *Clin Exp Hypertens.* 26(4):323-333.
- Bailly-Maitre B, de Sousa G, Boulukos K, Gugenheim J, Rahmani R (2001) Dexamethasone inhibits apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes via Bcl-2 and Bcl-xL induction. *Cell Death Differ.* 8: 279-288.
- Bar-Am O, Weinreb O, Amit T, Youdim MBH (2005) Regulation of Bcl-2 family proteins, neurotrophic factors, and APP processing in the neurorescue activity of propargylamine. *The FASEB Journal* (3) 252–258.
- Barrett CP, Donati EJ, Guth L (1984) Differences between adult and neonatal rats in their astroglial response to spinal injury. *Exp. Neurol.* 84:374-385.
- Baud V, Karin M (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 11(9):372-7.
- Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC (2000) Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 17: 915-925.
- Becher A, Drenckhahn A, Pahner I, Margittai M, Jahn R, Ahnert-Hilger G (1999) The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J Neurosci.* 19(6):1922-1931.
- Becher B, Prat A, Antel JP (2000) Brain-immune connection: immunoregulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* 29:293-304.
- Beer R, Franz G, Srinivasan A, Hayes RL, Pike BR, Newcomb JK, Zhao X, Schmutzhard E, Poewe W, Kampfl A (2000) Temporal profile and cell subtype distribution of activated caspase-3 following experimental traumatic brain injury. *Journal of Neurochemistry* 75: 1264-1273.
- Benowitz LI, Routtenberg A (1997) GAP-43: An intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci.* 20: 84–91.
- Berry M, Butt A, Logan A, (1999). Cellular responses to penetrating CNS injury. In: Berry M, Logan A., editors. *CNS Injuries: Cellular Responses and Pharmacological Strategies*. Boca Raton, FL: CRC Press; p.1.
- Bethea JR., Nagashima H, Acosta MC, Briceno C, Gomez F, Marcillo AE, Loores K, Green J, Dietrich WD (1999) Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor- α production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J. Neurotrauma.* 16: 851–863.
- Blackmore M, Letourneau PC (2006) Changes within maturing neurons limit axonal regeneration in the developing spinal cord. *J. Neurobiol.* 66: 348–360.
- Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 8(1):57-69.
- Bloomstrand F, Aberg ND, Eriksson PS, Hasson E, Ronnback L (1999) Extent of intercellular calcium wave propagation is related to gap junction permeability and level of connexin-43 expression in astrocytes in primary cultures from four brain regions. *Neuroscience* 92(1):255-265.

- Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR (1998) Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD- specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J.* 17: 37-49.
- Bovolenta P, Fernaud-Espinosa I (2000) Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. *Prog Neurobiol.* 61: 113-32.
- Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature.* 416(6881):636-40.
- Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Hu W-H, Frydel B, Bramwell A, Karmally S, Green EJ, Bethea JR (2005) Inhibition of astroglial nuclear factor κ B reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *The Journal of Experimental Medicine* 202:145-156.
- Brambilla R, Hurtado A, Persaud T, Esham K, Pearse DD, Oudega M, Bethea JR (2009) Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B leads to increased axonal sparing and sprouting following spinal cord injury. *J Neurochem.* 110(2):765-78.
- Breder CD, Tsujimoto M, Terano Y, Scott DW, Saper CB (1993) Distribution and characterization of tumor necrosis factor- α -like immunoreactivity in the murine central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 337:543-567.
- Breuner C.W., Orchinik M (2002) Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J. Endocrin.* 175: 99-112.
- Brown GC (2007) Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochem Soc Trans.* 35:1119-1121.
- Brown GC and Neher JJ (2010) Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol.* 41:242-247.
- Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtzberg FW, Mattson M.P (1996) Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat. Med.* 2: 788-794.
- Bruce AJ, Boling WW, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtzberg FW, Mattson MP (1996) Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nature Med* 2:788–794.
- Bruce-Keller AJ (1999) Microglial–Neuronal Interactions in Synaptic Damage and Recovery. *J Neurosci Res* 58:191–201.
- Buffo A, Rolando C, Ceruti S (2009) Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol.* 79(2):77-89.
- Cafferty WB, Yang SH, Duffy PJ, Li S, Strittmatter SM (2007) Functional axonal regeneration through astrocytic scar genetically modified to digest chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurosci* 27:2176-2185.
- Carson MJ, Bilousova TV, Puntambekar SS, Melchior B, Doose JM, Ethell IM (2007) A rose by any other name? The potential consequences of microglial heterogeneity during CNS health and disease. *Neurotherapeutics.* 4(4):571-579.

- Carson, MJ (2002) Microglia as liaisons between the immune and central nervous systems: Functional implications for multiple sclerosis. *Glia*, 40: 218-231.
- Chang CM, Lee MH, Wang TC, Weng HH, Chung CY, Yang JT (2009) Brain protection by methylprednisolone in rats with spinal cord injury. *Neuroreport*. 20(10):968-972.
- Chen Y, Swanson RA (2003) Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 23(2):137-49.
- Chen X, Lin YP, Wang D, Zhang JN (2010) Dexamethasone exacerbates spatial acquisition deficits after traumatic brain injury in rats. *Neurol Res*. 32(10):1097-102.
- Cheng B, Christakos S, Mattson MP (1994) Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 12: 139-153.
- Cho K-S, Yang L, Lu B, Ma HF, Huang X, Pekny M, Chen DF (2005) Re-establishing the regenerative potential of central nervous system axons in postnatal mice. *Journal of Cell Science* 118: 863-872.
- Chu Y, Jin X, Parada I., Pesic A, Stevens B, Barres B, Prince DA (2010) Enhanced synaptic activation, and DNA fragmentation during apoptosis in septohippocampal cultures. *J. Neurosci. Res*. 52: 505-520.
- Citron BA, Arnold PM, Sebastian C, Qin F, Malladi S, Ameenuddin S, Landis ME, Festoff BW (2000) Rapid up-regulation of caspase-3 in rat spinal cord after injury: mRNA, protein, and cellular localization correlates with apoptotic cell death. *Exp. Neurol*. 166: 213-226.
- Civitaresse AE, Carling S, Heilbronn LK, Hulver MH, Ukropcova B, Deutsch WA, Smith SR, Ravussin E; CALERIE Pennington Team (2007) Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med*. 2007 Mar;4(3):e76.
- Clark R, Lee E, Fish C, White R, Price W, Jonak Z, Feuerstein G, Barone F, (1993). Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study. *Brain Research Bulletin*, 31: 565.
- Clark R, Schiding J, Kaczorowski S, Marion D, Kochanek P (1994). Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: comparison of weight drop and controlled cortical impact models. *Journal of Neurotrauma*; 11:499.
- Clark RS, Kochanek PM, Watkins SC, Chen M, Dixon CE, Seidberg NA, Melick J, Loeffert JE, Nathaniel PD, Jin KL, Graham SH (2000) Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats. *J. Neurochem*. 74: 740-753.
- Clarner T, Parabucki A, Beyer C, Kipp M (2011) Corticosteroids impair remyelination in the corpus callosum of cuprizone-treated mice. *J Neuroendocrinol*. 23(7):601-611.
- Cubilla MA, Castañeda MM, Bachor TP, Suburo AM (2012) Glucocorticoid-dependent mechanisms in photoreceptor survival. *Adv Exp Med Biol*. 723:101-6.
- d'Avila JC, Lam TI, Bingham D, Shi J, Won SJ et al. (2012) Microglial activation induced by brain trauma is suppressed by post-injury treatment with a PARP inhibitor. *J Neuroinflammation* 9:31.
- Danton, GH, Dietrich, WSD (2003) Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *Curr. Opin. Crit. Care*. 2:86-91.

- David S, Aguayo A (1981) Axonal elongation into PN "bridges" after nervous system injury in adult rats. *Science*; 214: 931.
- Davies SJ, Goucher DR, Doller C, Silver J (1999) Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci.* 19(14):5810-22.
- Davies SJA, Field PM, Raisman G (1996). Regeneration of cut adult axons fails even in the presence of continuous aligned glial pathways. *Experimental Neurology*; 142(2): 203.
- Davies SJA, Goucher DR, Doller C, Silver J (1999). Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *Journal of Neuroscience*; 19(14): 5810.
- Diao L. H., Bickford P. C., Stevens J. O., Cline E. J. and Gerhardt G. A. (1997) Caloric restriction enhances evoked DA overflow in striatum and nucleus accumbens of aged Fischer 344 rats. *Brain Res.* 763, 276–280.
- Dubey A., Forster M. J., Lal H. and Sohal R. S. (1996) Effect of age and caloric intake on protein oxidation in different brain regions and on behavioral functions of the mouse. *Arch. Biochem. Biophys.* 333, 189–197.
- Eldadah BA, Faden AI (2000) Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J. Neurotrauma* 17: 811-829.
- Elliott EJ, Parks DA, Fishman PS (1997) Effect of proximal axotomy on GAP-43 expression in cortical neurons in the mouse. *Brain Res.* 755: 221–228.
- Emery DL, Royo NC, Fischer I, Saatman KE, McIntosh TK (2003) Plasticity following injury to the adult central nervous system: Is recapitulation of a developmental state worth promoting? *J. Neurotrauma* 20, 1271-1292.
- Emery E, Aldana P, Bunge MB, Puckett W, Srinivasan A, Keane RW, Bethea J, Levi AD (1998) Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J. Neurosurg.* 89: 911-920.
- Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Waeber C, Zhang L, Gomez-Isla T, Hyman BT, Moskowitz MA (1998) Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18: 238-247.
- Ennisa K, Trana P.V., Seaquist E.R., Rao R, (2008) Postnatal Age Influences Hypoglycemia-induced Neuronal Injury in the Rat Brain. *Brain Res.* 1224: 119–126.
- Environmental Exposure and Neurotoxicity *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8: 2980-3018
- Fan L, Young PR, Barone FC, Feuerstein GZ, Smith DH, McIntosh TK (1996) Experimental brain injury induces differential expression of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the CNS. *Brain Res Mol Brain Res* 36:287–291.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV, (2004). Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 24(9): 2143.
- Fawcett JW (2006). Overcoming inhibition in the damaged spinal cord. *Journal of Neurotrauma*, 23(3-4): 371.

- Fawcett JW (2006). The glial response to injury and its role in the inhibition of the CNS repair. In: Bahr M., editor. *Brain Repair*. Vol. 557. New York: Springer; Science. 06:11
- Federoff HJ, Grabczyk E, Fishman MC (1988) Dual regulation of GAP-43 gene expression by nerve growth factor and glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 263: 19290-19295
- Fine N, Mustoe T (2006). *Wound healing*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Fitch MT, Doller C, Combs CK, Landreth GE, Silver J (1999) Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. *J Neurosci.* 19(19):8182-8198.
- Frame LT, Hart RW, Leakey JEA. (1998) Caloric restriction as a mechanism mediating resistance to environmental disease. *Environmental Health Perspectives*. Vol 106. Supplement I. February
- Frame LT, Hart RW, Leakey JE (1998) Caloric restriction as a mechanism mediating resistance to environmental disease. *Environ Health Perspect.* 106 Suppl 1:313-24.
- Frank MG, Miguel ZD, Watkins LR, Maier SF (2010) Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to *E. coli* lipopolysaccharide. *Brain, Behavior, and Immunity* 24: 19–30.
- Frank MG, Thompson BM, Watkins LR, Maier SF (2012) Glucocorticoids mediate stress-induced priming of microglial pro-inflammatory responses. *Brain, Behavior, and Immunity* 26: 337–345.
- Galtery C.M., Fawcett J.W., 2007. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain research reviews.* 54: 1-18.
- Ge Y, Belcher SM, Pierce DR, Light KE (2004) Altered expression of Bcl2, Bad and Bax mRNA occurs in the rat cerebellum within hours after ethanol exposure on postnatal day 4 but not on postnatal day 9. *Molecular Brain Research* 129:124-134.
- George R, Griffin JW (1994). Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radiculotomy model. *Experimental Neurology*; 129(2): 225.
- Giulian D, Li J, Leara B, Keenen C (1994b). Phagocytic microglia release cytokines and cytotoxins that regulate the survival of astrocytes and neurons in culture. *Neurochemistry International*; 25(3): 227.
- Giulian D, Li J, Li X, George J, Rutecki P (1994a). The impact of microglia-derived cytokines upon gliosis in the CNS. *Developmental Neuroscience*; 16(3-4): 128.
- Goldberg JL, Barres BA (2000) The relationship between neuronal survival and regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 23: 579-612.
- González Denisellea M.C., Grilloa C.A., Gonzáleza S, Roigb P, De Nicolaa A.F. (1999) Evidence for down-regulation of GAP-43 mRNA in Wobbler mouse spinal motoneurons by corticosterone i a 21-aminosteroid. Research report.
- Gonzalez-Scarano F, Baltuch G (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 219-240.

- Gottesfeld Z, Moore AN, Dash PK (2002) Acute ethanol intake attenuates inflammatory cytokines after brain injury in rats: a possible role for corticosterone. *J Neurotrauma* 19:317–326.
- Gottron FJ, Ying HS, Choi DW (1997) Caspase inhibition selectively reduces the apoptotic component of oxygen-glucose deprivation-induced cortical neuronal cell death. *Mol. Cell Neurosci.* 9: 159-169.
- Gourin CG, Shackford SR (1997) Production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta by human cerebral microvascular endothelium after percussive trauma. *J Trauma* 42:1101–1107.
- Graber DJ, Hickey WF, Stommel EW, Harris BT (2012) Anti-inflammatory efficacy of dexamethasone and Nrf2 activators in the CNS using brain slices as a model of acute injury. *J Neuroimmune Pharmacol.* 7(1):266-78.
- Guarente L (2008) Mitochondria-- a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell.* 132(2):171-176.
- Gulino A, De Smaele E, Ferretti E (2009) Glucocorticoids and neonatal brain injury: the hedgehog connection. *J Clin Invest.* 119(2):243-246.
- Guo Z., Ersoz A., Butterfield D. A. and Mattson M. P. (2000) Beneficial effects of dietary restriction on cerebral cortical synaptic terminals: preservation of glucose transport and mitochondrial function after exposure to amyloid b-peptide and oxidative and metabolic insults. *J. Neurochem.* 75, 314–320.
- Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Beett MV, Charles AC, Kater SB (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci.* 19(2):520-528.
- Hailer NP (2008) Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: it is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells. *Prog Neurobiol* 84(3):211-233.
- Hall ED, McCall JM, Chase RL, Yonkers PA, Braughler JM (1987) A nonglucocorticoid steroid analog of methylprednisolone duplicates its high-dose pharmacology in models of central nervous system trauma and neuronal membrane damage. *J Pharmacol Exp Ther* 242:137–142.
- Hanisch UK (2001a) Microglia as a source and target of cytokine activities in the brain. In: Streit WJ, editor. *Microglia in the degenerating i regenerating CNS.* New York: Springer Verlag. P 79-124.
- Hanisch UK (2001b) Effects of interleukin-2 and interferons on the nervous system. In: Ader R, Felten DL, Cohen N, editors. *Psychoneuroimmunology.* San Diego: Academic Press. P 585-631.
- Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40(2):140-55.
- Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, Ayata C, Fink K, Huang Z, Shimizu-Sasamata M, Yuan J, Moskowitz MA (1997) Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2007-2012.
- Harry GJ, Lefebvre d'Hellencourt C, McPherson CA, Funk JA, Aoyama M, Wine RN (2008) Tumor necrosis factor p55 and p75 receptors are involved in chemical-induced apoptosis of dentate granule neurons. *J. Neurochem.* 106: 281-298.

- Hayashi T, Sakurai M, Abe K, Sadahiro M, Tabayashi K, Itoyama Y (1998) Apoptosis of motor neurons with induction of caspases in the spinal cord after ischemia. *Stroke* 29: 1007-1013.
- He J, Evans CO, HoVman SW, Oyesiku NM, Stein DG (2004) Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. *Exp Neurol* 189: 404–412.
- Heydari AR, Unnikrishnan A, Lucente LV, Richardson A (2007) Caloric restriction and genomic stability. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(22):7485-96.
- Hinkerohe D, Smikalla D, Schoebel A, Haghikia A, Zoidl G, Haase CG, Schlegel U, Faustmann PM (2010) Dexamethasone prevents LPS induced microglial activation and astroglial impairment in an experimental bacterial meningitis co-culture model. *Brain Res.* 1329:45-54.
- Holmes M.C., Seckl J.R., (2006) The role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases in the brain. *Molecular and Cellular Endocrinology* 248: 9-14.
- Holmin S, Mathiesen T (1996) Dexamethasone and colchicine reduce inflammation and delayed oedema following experimental brain contusion. *Acta Neurochir* 138:418–424.
- Hopkins SJ, Rothwell NJ (1995) Cytokines and the nervous system. I: Expression and Recognition. *Trends Neurosci.* 18:83-88.
- Hulsebosch CE, De Witt DS, Jenkins LW, Prough DS (1998) Traumatic brain injury in rats results in increased expression of Gap-43 that correlates with behavioral recovery. *Neurosci. Lett.* 255, 83–86.
- Hulsebosch CE, De Witt DS, Jenkins LW, Prough DS (1998) Traumatic brain injury in rats results in increased expression of Gap-43 that correlates with behavioral recovery. *Neurosci. Lett.* 255: 83–86.
- Idrobo F, Nandy K, Mostofsky DL, Blatt L, Nandy L (1987) Dietary restriction: effects on radial maze learning and lipofuscin pigment deposition in the hippocampus and frontal cortex. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 6, 355–362.
- Influenced by the Duration of Time in Culture and by Astrocyte-Neuron Interactions.
- Ingram D. K., Weindruch R., Spangler E. L., Freeman J. R. and Walford R. L. (1987) Dietary restriction benefits learning and motor performance of aged mice. *J. Gerontol.* 42, 78–81.
- Irazuzta J, Pretzlaff RK, DeCourten-Myers G, Zemlan F, Zingarelli B (2005) Dexamethasone decreases neurological sequelae and caspase activity. *Intensive Care Med.* 31(1):146-150.
- Ismaili N; Garabedian M.J. (2004) Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1024: 86-101.
- Ivkovic S, Kanazir S, Stojiljkovic M, Rakic Lj, Ruzdijic S (1994) Desensitization of c-fos mRNA expression in rat brain following cortical lesions. *Moll. Cell. Neurosci.* 5, 11-22.
- J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 62, 127-136.
- Jamieson PM, Fuchs E, Flugge G, Seckl JR. (1997) Attenuation of hippocampal 11beta hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by chronic psychosocial stress in the tree shrew. *Stress* 2: 123–132.

- Johansen FF, Diemer NH (1986) Influence of the plasma glucose level on brain damage after systemic kainic acid injection in the rat. *Acta Neuropathol (Berl)*; 71:46-54.
- Keane RW, Srinivasan A, Foster LM., Testa MP, Ord T, Nonner D, Wang HG, Reed C, Bredesen DE, Kayalar C (1997) Activation of CPP32 during apoptosis of neurons and astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 48:168–180.
- Klebanov S, Diais S, Stavinoha WB, Suh Y, Nelson JF (1995) Hyperadrenocorticism, attenuated inflammation, and the life-prolonging action of food restriction in mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 50(2):B78-82.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275: 1132-1136.
- Knobloch SM, Fan L, Faden AI (1999) Early neuronal expression of tumor necrosis factor-alpha after experimental brain injury contributes to neurological impairment. *J Neuroimmunol* 95:115–125.
- Kouda K, Iki M (2010) Beneficial effects of mild stress (hormetic effects): dietary restriction and health. *J Physiol Anthropol.* 29(4):127-132.
- Kraft AD, Harry JG (2011) Features of Microglia and Neuroinflammation Relevant to
- Kraft AD, McPherson CA, Harry GJ (2009) Heterogeneity of microglia i TNF signaling as determinants for neuronal death or survival. *Neurotoxicology* 30(5):785-793.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19(8):312-8. Review.
- Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gélinas C (2003) To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene.* 22(56):8961-82.
- Kuida K., Zheng T. S., Na S., Kuan C., Yang D., Karasuyama H., Rakic P., and Flavell R. A. (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384:368–372.
- Kulms D, Schwarz T (2006) NF-kappaB and cytokines. *Vitam Horm.* 74:283-300.
- Lal H, Forster MJ, Sohal RS (1995) Oxidative brain damage in aged mice. Protection by caloric reduction. *Ann N Y Acad Sci.* 765:308.
- Lambertsen KL, Biber K, Finsen B (2012) Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* doi: 10.1038/jcbfm.2012.88.
- Latchman DS (1995) Cell stress genes and neuronal protection. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 21, 475–477.
- Leakey J.E.A., Bazare J. Jr., Harmonr J.R., Feuertsp J., Duffy H., Hart R.W. (1991). Effects of long-term caloric restriction on hepatic drug metabolizing enzyme activities in the Fischer 344 rat. *Biological Effects of Dietary Restriction.* L. Fishbein, Ed. Springer-Verlag. New York
- Leakey JEA, Seng JE, Barnas CR, Baker VM, Hart RW (1998) A mechanistic basis for the beneficial effects of dietary restriction on longevity i disease. Consequences for the interpretation of rodent toxicity studies. *Int. J. Toxicol.* 62: 133-141.

- Leakey JE, Chen S, Manjgaladze M, Turturro A, Duffy PH, Pipkin JL, Hart RW (1994) Role of glucocorticoids and "caloric stress" in modulating the effects of caloric restriction in rodents. *Ann N Y Acad Sci.* 719:171-194.
- Leal AM, Forsling ML, Moreira AC. (1995) Diurnal variation of the pituitary-adrenal and AVP responses to stress in rats under food restriction. *Life Sci.* 56:191-198.
- Lee J, Auyeung WW, Mattson MP (2003) Interactive effects of excitotoxic injury and dietary restriction on microglial activation and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Neuromolecular Med* 4(3):179-196.
- Lee J, Bruce-Keller A.J., Kruman Y, Chao S.L., Mattson M.P. (1999) 2-Deoxy-D-glucose protects hippocampal neurons against excitotoxic injury: evidence for the involvement of stress proteins. *J. Neurosci. Res.* 57:48-61.
- Lee J, Duan W, Mattson MP (2002a) Evidence that BDNF is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J. Neurochem.* 82, 1367–1375.
- Lee J, Duan W, Long JM, Ingram DK, Mattson MP (2000) Dietary restriction increases survival of newly-generated neural cells and induces BDNF expression in the dentate gyrus of rats. *J. Mol. Neurosci.* 15, 99–108.
- Lee J, Seroogy KB, Mattson MP (2002b) Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *J. Neurochem.* 80, 539–547.
- Lefrançois T, Fages C, Peschanski M, Tardy M (1997) Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA in injured neuron-astrocyte cocultures. *J Neurosci.* 17(11):4121-4128.
- Li M, Ona VO, Chen M, Kaul M, Tenneti L, Zhang X, Stieg PE, Lipton SA, Friedlander RM (2000) Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience* 99: 333-342.
- Limbourg FP, Liao JK (2003) Nontranscriptional actions of the glucocorticoid receptor. *J Mol Med (Berl).* 81(3):168-174.
- Lin SJ, Defossez PA, Guarente L (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289, 2126–2128.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147-157.
- Liu WL, Lee YH, Tsai SY, Hsu CY, Sun YY, Yang LY, Tsai SH, Yang WC (2008) Methylprednisolone inhibits the expression of glial fibrillary acidic protein and chondroitin sulfate proteoglycans in reactivated astrocytes. *Glia* 56(13):1390-1400.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods* 25, 402-408.
- Loncarevic-Vasiljkovic N, Pesic V, Todorovic S, Popic J, Smiljanic K, Milanovic D, Ruzdijic S, Kanazir S (2012) Caloric restriction suppresses microglial activation and prevents neuroapoptosis following cortical injury in rats. *PLoS One.* 7(5):e37215.

- Loncarević-Vasiljković N, Pešić V, Tanić N, Milanović D, Popić J, Kanazir S, Ruzdijić S (2009) Changes in markers of neuronal and glial plasticity after cortical injury induced by food restriction. *Exp Neurol.* 220(1):198-206.
- Low SC, Moisan MP, Noble J.M, Edwards CR., Seckl JR. (1994) Glucocorticoids regulate hippocampal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity and gene expression in vivo in the rat. *J. Neuroendocrinol.* 6: 285–290.
- Madinier A, Bertrand N, Mossiat C, Prigent-Tessier A, Beley A et al. (2009) Microglial Involvement in Neuroplastic Changes Following Focal Brain Ischemia in Rats. *PLoS ONE* 4(12): e8101.
- Marinkovic P, Pešić V, Loncarević N, Smiljanic K, Kanazir S, Ruzdijic S (2007) Behavioral and biochemical effects of various food-restriction regimens in the rats. *Physiol. Behav.* 92, 492–499.
- Martin B, Mattson MP, Maudsley S (2006) Caloric restriction and intermittent fasting: Two potential diets for successful brain aging. *Ageing Research Reviews.* 5: 332-353.
- Martin P (1997). Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 276(5309): 75
- Masliah E, Mallory M, Hansen L, Alford M, Albright T, DeTeresa R, Terry R, Baudier J, Saitoh T (1991) Patterns of aberrant sprouting in Alzheimer's disease. *Neuron* 6: 729–739.
- Masoro E.J., Katz M.S, McMahan C.A. (1989) Evidence for the glycation hypothesis of aging from the food-restricted rodent model. *J. Gerontol.* 44:B20-B22
- Masoro E.J., McCarter R.J.M., Katz M.S., McMahan C.A. (1992) Dietary restriction alters characteristics of glucose fuel use. *J. Gerontol.* 47: B202-8208
- Masoro EJ (2000) Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol.* 35(3):299-305.
- Masoro EJ (2007) The role of hormesis in life extension by dietary restriction. *Interdiscip Top Gerontol.* 35:1-17.
- Masoro EJ (2009) Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: a critique of proposed mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 1790(10):1040-8.
- Matsui F, Oohira A (2004) Proteoglycans and injury of the central nervous system. *Congenital Anomalies.* 44: 181-8
- Mattson M.P (2005) Energy intake, meal frequency, and health: a neurobiological perspective. *Annu. Rev. Nutr.* 25: 12.1-12.24.
- Mattson MP (1997) Neuroprotective signal transduction: relevance to stroke. *Neurosci Biobehav Rev.* 21(2):193-206.
- Mattson MP, Cheng B, Baldwin SA, Smith-Swintosky VL, Keller J, Geddes JW, Scheff SW, Christakos S (1995) Brain injury and tumor necrosis factors induce calbindin D-28k in astrocytes: Evidence for a cytoprotective response. *J. Neurosci. Res.* 42: 357-370.
- Mattson MP, Duan W, Guo Z (2003) Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease: cellular and molecular mechanisms. *Journal of Neurochemistry,* 84:417-431.

- Mattson MP, Camandola S (2001) NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest.* 107(3):247-254.
- McCull A, Michlewska S, Dransfield I, Rossi AG (2007) Effects of glucocorticoids on apoptosis and clearance of apoptotic cells. *ScientificWorldJournal.* 7:1165-81.
- McCoy MK, Tansey MG (2008) TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation.* 17: 5:45.
- McKeon RJ, Jurynek MJ, Buck CR (1999). The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *Journal of Neuroscience;* 19(24): 10778.
- Meffert MK, Baltimore D (2005) Physiological functions for brain NF-kappaB. *Trends Neurosci.* 28(1):37-43.
- Menet V, Giménez y Ribotta M, Chauvet N, Drian MJ, Lannoy J, Colucci-Guyon E, Privat A (2001) Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J Neurosci.* 21(16):6147-6158.
- Menet V, Giménez Y Ribotta M, Sandillon F, Privat A (2000) GFAP null astrocytes are a favorable substrate for neuronal survival and neurite growth. *Glia.* 31(3):267-272.
- Menet V, Prieto M, Privat A, Giménez y Ribotta M (2003) Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(15):8999-9004.
- Miksik I., Struzinsky R., Deyl Y.Z. (1991) Change with age of UV absorbance and fluorescence of collagen i accumulation of c-hexosyllysine in collagen from Wistar rats living on different food restriction regimes. *Mech. Ageing Dev.* 57: 163-174.
- Minami M, Kuraishi Y, Satoh M (1991) Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1B, IL-6, TNF and LIF in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 176:593–598.
- Mizuno T, Sawada M, Suzumura A, Marunouchi T (1994) Expression of cytokines during glial differentiation. *Brain Res.* 656(1):141-46.
- Mladenovic Djordjevic A, Perovic M, Tesic V, Tanic N, Rakic L, Ruzdijic S, Kanazir S (2010) Long-term dietary restriction modulates the level of presynaptic proteins in the cortex and hippocampus of the aging rat. *Neurochem Int.* 56(2):250-255.
- Moisan M-P, Seckl JR., Edwards CRW (1990) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase bioactivity and messenger RNA expression in rat forebrain: localization in hypothalamus, hippocampus and cortex. *Endocrinology* 127: 1450-1455.
- Mucke L, Oldstone M, Morris J, Nerenberg M, (1991). Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. *New Biology;* 3(5): 465.
- Muñoz-Fernández MA, Fresno M (1998) The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol.* 56(3):307-40.

- Nakajima K, Honda S, Tohyama Y, Imai Y, Kohsaka S, Kurihara T (2001). Neurotrophin secretion from cultured microglia. *Journal of Neuroscience Research*; 65(4): 322.
- Neumann H, Schweigreiter R, Yamashita T, Rosenkranz K, Wekerle H, Barde YA (2002) Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a rho-dependent mechanism. *J Neurosci* 22:854-862.
- Newton R (2000) Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* 55 (7): 603-613.
- Ni B, Wu X, Su Y, Stephenson D, Smalstig EB, Clemens J, Paul SM (1998) Transient global forebrain ischemia induces a prolonged expression of the caspase-3 mRNA in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18: 248-256.
- Nicholas RS, Stevens S, Wing MG, Compston DA (2002) Microglia-derived IGF-2 prevents TNF α induced death of mature oligodendrocytes in vitro. *J Neuroimmunol.* 124(1-2):36-44.
- Nichols NR, Osterburg HH, Masters JN, Millar SL, Finch CE (1990). Messenger RNA for glial fibrillary acidic protein is decreased in rat brain following acute and chronic corticosterone treatment. *Brain Res Mol Brain Res.* 7(1):1-7.
- Norenberg M (2005). The reactive astrocyte. In: Aschner M, Costa L., editors. *The role of Glia in Neurotoxicity.* Boca Raton, FL: CRC Press; p. 73.
- O'Neill, L.A., and C. Kaltschmidt. 1997. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* 20: 7975-7980.
- O'Neill LA, Kaltschmidt C (1997) NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* 20(6):252-8.
- Owens T, Babcock AA, Millward JM, Toft-Hansen H (2005) Cytokine and chemokine inter-regulation in the inflamed or injured CNS. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 48: 178-184.
- Patel N.V., Finch C.E. (2007) The glucocorticoid paradox of caloric restriction in slowing brain aging. *Neurobiology of Aging* 23:707-717.
- Patel NV, Finch CE (2002) The glucocorticoid paradox of caloric restriction in slowing brain aging. *Neurobiol Aging.* 23(5):707-17.
- Patel NV, Finch CE (2002) The glucocorticoid paradox of caloric restriction in slowing brain aging. *Neurobiol Aging.* 23(5):707-717.
- Pekny M, Johansson CB, Eliasson C, Stakeberg J, Wallén A, Perlmann T, Lendahl U, Betsholtz C, Berthold CH, Frisén J (1999) Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J Cell Biol.* 145(3):503-514.
- Pekovic S, Subasic S, Nedeljkovic N, Bjelobaba I, Filipovic R et al. (2006) Molecular basis of brain injury and repair. In: Ruzdijic S, Rakic Lj, editors. *Neurobiological Studies - From Genes to Behaviour.* India: Research Signpost 143-165.
- Pelletier G, Luu-The V, Li S, Bujold G, Labrie F (2007) Localisation and glucocorticoid regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 mRNA in the male mouse forebrain. *Neuroscience* 145: 110-115.

- Perovic M, Mladenovic Djordjevic A, Smiljanic K, Tanic N, Rakic L, Ruzdijic S, Kanazir S (2009) Expression of cholesterol homeostasis genes in the brain of the male rat is affected by age and dietary restriction. *Biogerontology*. 10(6):735-45.
- Pickering M, Cumiskey D, O'Connor JJ (2005) Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Exp. Physiol*. 90:663-670.
- Pike BR, Zhao X, Newcomb JK, Wang KK, Posmantu RM, Hayes RL (1998) Temporal relationships between de novo protein synthesis, calpain and caspase 3-like protease
- Plunet WT, Streijger F, Lam CK, Lee JH, Liu J, Tetzlaff W (2008) Dietary restriction started after spinal cord injury improves functional recovery. *Exp Neurol*. 213(1):28-35.
- Polikov VS, Tresco PA, Reichert WM (2005). Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes. *Journal of Neuroscience Methods*; 148(1): 1
- Pöppelmann B, Klimmek K, Strozyk E, Voss R, Schwarz T, Kulms D (2005) NF{ κ }B-dependent down-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated proteins contributes to interleukin-1-mediated enhancement of ultraviolet B-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 280(16):15635-15643.
- Porter AG, Jänicke RU (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 6:99–104.
- Privat A (2003) Astrocytes as support for axonal regeneration in the central nervous system of mammals. *Glia* 43:91-93.
- Pulliam L, Zhou M, Stubblebine M, Bitler CM (1998) Differential modulation of cell death proteins in human brain cells by tumor necrosis factor alpha and platelet activating factor. *J Neurosci Res* 54:530–538.
- Raivich G (2005) Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends Neurosci* 28(11):571-573.
- Ramon y Cajal, S (1928) *Degeneration and Regeneration of the Nervous System* (Hafner, New York)
- Rath PC, Aggarwal BB (1999) TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol* 19, 350-364.
- Reul JM, Van den Bosch FR, De Kloet ER. (1987) Differential response of type I and type II corticosteroid receptors to changes in plasma steroid level and circadian rhythmicity. *Neuroendocrinology* 45:407-412.
- Reul, J.M.H.M., De Kloet, E.R., (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution i differential occupation. *Endocrinology* 117, 2505–2512.
- Rhodes JK. (2003) Actions of glucocorticoids and related molecules after traumatic brain injury. *Mol. Pharmacol.*, 65:890-896.
- Rich NJ, Van Landingham JW, Figueiroa S, Seth R, Corniola RS, Levenson CW (2010) Chronic caloric restriction reduces tissue damage and improves spatial memory in a rat model of traumatic brain injury. *J Neurosci Res*. 88(13):2933-9.

- Richardson PM., McGuinness UM., Aguayo AJ (1980) Axons from CNS neurones regenerate into PNS grafts. *Nature* 284, 264±265.
- Roberge, M.C., Messier, C., Staines, W.A., Plamondon, H., (2008) Food restriction induces long-lasting recovery of spatial memory deficits following global ischemia in delayed matching and non-matching-to-sample radial arm maze tasks. *Neurosci.* 156, 11-29.
- Rogove AD, Lu W, Tsirka SE (2002) Microglial activation and recruitment, but not proliferation, suffice to mediate neurodegeneration. *Cell Death Differ* 9(8):801-806.
- Rolls A, Shechter R, Schwartz M (2009) The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci* 10:235-241.
- Rothwell NJ, Hopkins SJ (1995) Cytokines and nervous system II: actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* 18:130-136.
- Rozovsky I, Laping NJ, Krohn K, Teter B, O'Callaghan J, Finch CE (1995) Transcriptional Regulation of Glial Fibrillary Acidic Protein by Corticosterone in Rat Astrocytes in Vitro Is
- Rubin LL, Staddon JM, (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annual Review of Neuroscience*; 22(1): 11.
- Sabatino F, Masoro EJ, McMahan A, Kuhn RW (1991) Assessment of the role of the glucocorticoid system in aging processes in the action of the food restriction. *J. Gerontol.* 46: B171-B179.
- Sandhir R, Puri V, Klein RM, Berman NE (2004) Differential expression of cytokines and chemokines during secondary neuron death following brain injury in old and young mice. *Neurosci Lett* 369:28–32
- Sandvig A, Berry M, Barret L, Butt A, Logan A (2004). Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia*, 46(3): 225.
- Sasson R, Tajima K, Amsterdam A (2001) Glucocorticoids protect against apoptosis induced by serum deprivation, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and p53 activation in immortalized human granulosa cells: involvement of Bcl-2. *Endocrinology.* 142(2):802-811.
- Saunders NR, Deal A, Knott GW, Varga ZM, Nicholls JG (1995) Repair and recovery following spinal cord injury in a neonatal marsupial (*Monodelphis domestica*). *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22:518-526.
- Schirmer-Mikalsen K, Vik A, Gisvold S.E., Hynne H, Klepstad P. (2007) Severe head injury: control of physiological variables, organ failure and complications in the intensive care unit. *Acta Anaesthesiol.Sci.* 51: 1194–1201.
- Schmued LC, Hopkins KJ (2000a) Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 874: 123-130.
- Schmued LC, Hopkins KJ (2000b) Fluoro-Jade: novel fluorochromes for detecting toxicant-induced neuronal degeneration. *Toxicol Pathol* 28: 91-99.
- Schwartz M, (2003). Macrophages and microglia in central nervous system injury: are they helpful or harmful? *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 23: 385.

- Schwartz NB, Domowicz M (2004) Proteoglycans in brain development. *Glycoconjugate Journal*. 21: 329-341.
- Seckl J.R. (1997) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? *Front. Neuroendocrinol.* 18: 49–99.
- Seckl JR, Walker BR. (2004) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a modulator of glucocorticoid action: from metabolism to memory. *Trends Endocrinol. Metab.* 15(9):418-424.
- Selmaj KW, Farooq M, Norton WT, Raine CS, Brosnan CF (1990) Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J Immunol.* 144(1):129-135.
- Selmaj KW, Raine CS (1988) Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol.* 23(4):339-46.
- Seung UK, de Vellis J (2005) Microglia in health and disease. *Journal of Neuroscience Research.* 81(3): 302.
- Sharma D, Jelacic J, Chennuri R, Chaiwat O, Chi ler W, Vavilala MS. (2009) Incidence and risk factors for perioperative hyperglycemia in children with traumatic brain injury. *Anesth. Analg.* 108:81-89.
- Sharma S, Kaur G (2005) Neuroprotective potential of dietary restriction against kainate-induced excitotoxicity in adult male Wistar rats. *Brain Res. Bull.* 67, 482-491.
- Sharma S, Kaur G (2008) Dietary restriction enhances kainate-induced increase in NCAM while blocking the glial activation in adult rat brain. *Neurochem. Res.* 33, 1178-1188.
- Shein NA, Grigoriadis N, Horowitz M, Umschwief G, Alexandrovich AG, Simeonidou C, Grigoriadis S, Touloumi O, Shohami E. (2008) Microglial involvement in neuroprotection following experimental traumatic brain injury in heat-acclimated mice. *Brain Res.* 1244:132-141.
- Shibata M, Hisahara S, Hara H, Yamawaki T, Fukuuchi Y, Yuan J, Okano, H, Miura M (2000) Caspases determine the vulnerability of oligodendrocytes in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* 106: 643-653.
- Shohami E, Bass R, Wallach D, Yamin A, Gallily R (1996) Inhibition of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) activity in rat brain is associated with cerebroprotection after closed head injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16: 378-384.
- Shohami E, Novikov M, Bass R, Yamin A, Gallily R (1994) Closed head injury triggers early production of TNF alpha and IL-6 by brain tissue. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:615–619.
- Shoyo H, Kibayashi, K (2006) Changes in localization of synaptophysin following fluid percussion injury in the rat brain. *Brain Res.* 1078, 198-211.
- Silver J, Miller JH, (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(2): 146.
- Simpson CS, Morris BJ (2000) Regulation of neuronal cell adhesion molecule expression by NF-kappa B. *J Biol Chem.* 275(22):16879-84.

- Singh P, Heera PK, Kaur G (2003) Expression of neuronal plasticity markers in hypoglycemia induced brain injury. *Mol. Cell. Biochem.* 247: 69-74.
- Siren, A.L., R. McCarron, L. Wang, P. Garcia-Pinto, C. Ruetzler, D. Martin, and J.M. Hallenbeck. 2001. Proinflammatory cytokine expression contributes to brain injury provoked by chronic monocyte activation. *Mol. Med.* 7:219–229.
- Skulachev VP (1998) Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett.* 423: 275-280.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ (1999) Ordering the Cytochrome c-initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase-9-dependent Manner. *J. Cell Biol.* 144, 281-292.
- Spataro L, Dilgen J, Retterer S, Spence AJ, Isaacson M, Turner JN, Shain W (2005) Dexamethasone treatment reduces astroglia responses to inserted neuroprosthetic devices in rat neocortex. *Exp Neurol.* 194(2):289-300.
- Springer J, Azbill R, Knapp P (1999) Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nature Medicine.* 5: 943-946.
- Springer J, Azbill R, Nottingham S, Kennedy S (2000) Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.* 20: 7246-7251.
- Springer JE (2002) Apoptotic cell death following traumatic injury to the central nervous system. *J Biochem Mol Biol* 35(1):94-105.
- Stewart J., Meaney M.J., Jensen A.L., Kalant N. (1988) The effects of acute and long-life food restriction on basal and stress-induced serum corticosterone levels in young and aged rats. *Endocrinology* 123: 1934-1941
- Stoica B, Byrnes K, Faden AI (2009) Multifunctional drug treatment in neurotrauma. *Neurotherapeutics* 6(1):14-27.
- Stoica B, Byrnes K, Faden AI (2009) Multifunctional drug treatment in neurotrauma. *Neurotherapeutics* 6(1):14-27.
- Stojadinovic O, Lee B, Vouthounis C, Vukelic S, Pastar I, Blumenberg M, Brem H, Tomic-Canic M (2006) Novel genomic effects of glucocorticoids in epidermal keratinocytes: inhibition of apoptosis, interferon-gamma pathway, and wound healing along with promotion of terminal differentiation. *J Biol Chem.* 282(6):4021-34.
- Strata P, Buffo A, Rossi F (1999) Mechanisms of axonal plasticity. *Arch. Ital. Biol.* 137, 181-192.
- Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE (1995) Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke* 26: 2135–2144.
- Stroh C, Schulze-Osthoff K (1998) Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 5:997–1000.
- Stroncek JD, Reichert MW (2008) Overview of wound healing in different tissue types. *Frontiers in neuroengineering.*

- Suemaru S, Hashimoto K, Hattori T, Inoue H, Kageyama J, Ota Z. (1986) Starvation-induced changes in rat brain corticotropin-releasing factor (CRF) i pituitary-adrenocortical response.
- Sugama S, Takenouchi T, Kitani H, Fujita M, Hashimoto M (2009) Microglial activation is inhibited by corticosterone in dopaminergic neurodegeneration. *J Neuroimmunol.* 208(1-2):104-14.
- Sze JY., Victor M, Loer C, Shi Y, Ruvkun G (2000) Food and metabolic signalling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. *Nature* 403, 560–564.
- Tanic N, Perovic M, Mladenovic A, Ruzdijic S, Kanazir S (2007) Effects of aging, dietary restriction and glucocorticoid treatment on housekeeping gene expression in rat cortex and hippocampus-evaluation by real time RT-PCR. *J Mol Neurosci.* 32(1):38-46.
- Tarsa L, Goda Y (2002) Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1012–1016.
- Taupin V, Toulmond S, Serrano A, Benavides J, Zavala F (1993) Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. *J Neuroimmunol* 42:177–186.
- Taupin V, Toulmond S, Serrano A, Benavides J, Zavala F (1993) Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand. *J Neuroimmunol* 42:177–185.
- Thomas WE (1992) Brain macrophages: Evaluation of microglia and their functions. *Brain Res. BrainRes. Rev.* 17: 61-74.
- Turner JN, Shain W, Szarowski DH, Andersen M, Martins S, Isaacson M, Craighead H (1999). Cerebral astrocyte response to micromachined silicon implants. *Experimental Neurology*; 156(1): 33.
- Tuttolomondo A, Di Sciacca R, Di Raimondo D, Renda C, Pinto A et al. (2009) Inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke treatment. *Curr Top Med Chem* 9(14): 1240-1260.
- van Ginhoven TM, Dik WA, Mitchell JR, Smits-te Nijenhuis MA, van Holten-Neelen C (2011) Dietary restriction modifies certain aspects of the postoperative acute phase response. *Journal of Surgical Research.* 171: 582-589.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3: 0034.I-0034.II.
- Veenith T, Goon SSH, Burnstein RM (2009) Molecular mechanisms of traumatic brain injury: the missing link in management. *World Journal of Emergency Surgery* 2;4:7
- Velier JJ, Ellison JA, Kikly KK, Spera PA, Barone FC, Feuerstein GZ (1999) Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *J. Neurosci.* 19: 5932-5941.
- Venters HD, Dantzer R, Kelley KW (2000) A new concept in neurodegeneration: TNF α is a silencer of survival signals. *Trends Neurosci.* 23: 175-180.
- Villa P., Kaufmann S. H., and Earnshaw W. C. (1997) Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem. Sci.* 22:388–393.

- Walker N. P., Talanian R. V., Brady K. D., Dang L. C., Bump N. J., Ferenz C. R., Franklin S., Ghayur T., Hackett M. C., and Hammill L. D. (1994) Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 78:343–352.
- Wang DD, Bordey A (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol.* 86(4):342-367.
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007) The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 184(1-2):53-68.
- Wang X, Feuerstein GZ, Xu L, Wang H, Schumacher WA, Ogletree ML, Taub R, Duan JJ, Decicco CP, Liu RQ (2004) Inhibition of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by a selective antagonist protects brain from focal ischemic injury in rats.
- Weindruch R, Sohal RS (1997) Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *N Engl J Med.* 337(14):986-94.
- Weitz TM, Town T (2012) Microglia in Alzheimer's Disease: It's All About Context. *Int J Alzheimers Dis.* 2012:314185.
- Wen LP, Madani K, Fahrni JA, Duncan SR, Rosen GD (1997) Dexamethasone inhibits lung epithelial cell apoptosis induced by IFN-gamma and Fas. *Am J Physiol.* 273(5 Pt 1):L921-9.
- Wiedenmann B, Franke WW (1985) Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of M 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 45, 1017-1028.
- Wilhelmsson U, Li L, Pekna M, Berthold CH, Blom S, Eliasson C, Renner O, Bushong E, Ellisman M, Morgan TE, Pekny M (2004) Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *J. Neurosci.* 24: 5016–5021.
- Xu J, Fan G, Chen S, Wu Y, Xu XM, Hsu CY (1998) Methylprednisolone inhibition of TNF-alpha expression and NF-kB activation after spinal cord injury in rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 59(2):135-42.
- Yakovlev AG, Knobloch SM, Fan L, Fox GB, Goodnight R, Faden AI (1997) Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis in neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J. Neurosci.* 17: 7415-7424.
- Yang JC, Cortopassi GA (1998) Induction of the mitochondrial permeability transition causes release of the apoptogenic factor cytochrome c. *Free. Radic. Biol. Med.* 24: 624-631.
- Yazawa H, Sasagawa I, Suzuki Y, Nakada T (2001) Glucocorticoid hormone can suppress apoptosis of rat testicular germ cells induced by testicular ischemia. *Fertil Steril.* 75(5):980-5.
- Yeung J. M. and Friedman E. (1991) Effect of aging and diet restriction on monoamines and amino acids in cerebral cortex of Fischer-344 rats. *Growth Dev. Aging* 55, 275–283.
- Zhang D, Hu X, Qian L, O'Callaghan JP, Hong J-S, (2010) Astroglialosis in CNS pathologies: Is there a role for microglia? *Mol Neurobiol* 41:232-241.
- Zhu C, Wang X, Hagberg H, Blomgren K (2000) Correlation Between Caspase-3 Activation and Three Different Markers of DNA Damage in Neonatal Cerebral Hypoxia/Ischemia. *J. Neurochem.* 75: 819-829.

Zurn A, Bandtlow C (2006). Regeneration failure in the CNS: cellular and molecular mechanisms.
In: Bahr M., editor. Brain Repair. Vol. 557. New York: Springer; Science.

BIOGRAFIJA AUTORA

Nataša Lončarević-Vasiljković je rođena 25.03.1977. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala 1996. godine, a završila 2004. godine na studijskoj grupi Opšta biologija sa opštim uspehom 8,84 u toku studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske studije je upisala 2006. godine na smeru Molekularna biologija na Biološkom fakultetu. Od 2005. godine je zaposlena na Odeljenju za neurobiologiju, u Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” Univerziteta u Beogradu.

Naučno-istraživački rad Nataše Lončarević-Vasiljković realizovan je kroz projekte finansirane od strane Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije. U periodu 2005 - 2006. godine učestvovala je u realizaciji projekta „Plastičnost mozga: neuronalna genska ekspresija u fiziološkim i patološkim uslovima“ (projekat 1641, Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije, rukovodilac dr Selma Kanazir). U periodu 2006 - 2010. godine učestvovala je u realizaciji projekta „Molekularna i bihejvioralna ispitivanja plastičnosti mozga“ (projekat 143004, Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, rukovodilac dr Selma Kanazir). Od 2011. godine učesnik je projekta „Plastičnost mozga tokom starenja: uticaj dijetalne restrikcije i anestezije“ (projekat ON173056, Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije, rukovodilac dr Selma Kanazir). U okviru ovoga projekta je i istraživački zadatak koji se odnosi na izradu njene doktorske teze pod mentorstvom dr Selme Kanazir i dr Nadežde Nedeljković.

Autor je 2 i koautor 3 rada u vodećim međunarodnim časopisima, kao i brojnih domaćih i međunarodnih kongresnih saopštenja.