

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena Popić

**UTICAJ PROPOFOLA NA SIGNALNI PUT  
NEUROTROFINA U PREDNJEM MOZGU  
PACOVA STARIH 14 DANA**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena Popić

**PROPOFOL-INDUCED CHANGES IN  
NEUROTROPHIC SIGNALING  
IN 14-DAY-OLD RAT FOREBRAIN**

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, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

### 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“

Datum odbrane:

## **ZAHVALNICA**

*Ova doktorska teza 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 i projekta “The role of neurotrophins in anesthesia-induced developmental neuroapoptosis”, koji finansira National Institute of Health (NIH) putem John E. Fogarty nagrade (FIRCA award, GC11479-128322), čiji su nosioci dr Sabera Ruždijić (Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu) i dr Vesna Jevtović-Todorović (University of Virginia Health System, Charlottesville, United States of America).*

*Zahvaljujem se svojim mentorima dr Saberi Ruždijić i dr Selmi Kanazir 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. Zahvaljujem se na pruženoj podršci i poverenju, kao i na omogućenim odličnim uslovima za eksperimentalni rad.*

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

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Vesni Pešić i dr Desanki Milanović koje su mi dozvolile da učim od njih i strpljivo vodile kroz doktorat nesebično dajući svoje znanje, iskustvo i dragoceno vreme. Hvala na velikoj posvećenosti i neprocenjivoj pomoći u izradi ove disertacije, na pomoći u eksperimentalnom radu, kao i na mnogobrojnim plodnim diskusijama.*

*Zahvaljujem se kolegama iz Laboratorije za molekularnu neurobiologiju Aleksandri, Milki i Vesni na podršci i drugarskoj atmosferi, a izuzetnu zahvalnost dugujem Kosari, Nataši, Tijani i Smilji za divna prijateljstva koja su obeležila ovaj period.*

## APSTRAKT

### Uticaj propofola na signalni put neurotrofina u prednjem mozgu pacova starih 14 dana

Neurotrofini čine familiju signalnih molekula sa brojnim uticajima na rast, preživljavanje, diferencijaciju i sinaptičku plastičnost postmitotskih neurona, kako u adultnom mozgu, tako i u mozgu tokom razvića. Neurotrofini (BDNF, NGF) se sa određenim afinitetom vezuju za Trk receptore, iniciraju njihovu dimerizaciju i autofosforilaciju i na taj način se pokreće aktivacija signalnih puteva kao što su PI3K/Akt i MAPK/ERK. Akt i ERK kinaze imaju ključne regulatorne uloge u mozgu u procesima kao što su neuronalna proliferacija, diferencijacija, razviće, migracija, preživljavanje i dugotrajna sinaptička plastičnost. Aktivan (fosforilisan) Akt štiti ćeliju od apoptoze tako što stimuliše ekspresiju proteina koji favorizuju preživljavanje ćelija i sa druge strane inhibira egzekutorske kaspaze. Aktivacija ERK1/2 kinaze pomoviše preživljavanje, međutim u određenim uslovima ERK1/2 može imati i pro-apoptotske odlike. S obzirom da je uloga neurotrofina u neurotoksičnosti koja je indukovana anestezijom tokom ranog postnatalnog razvića pokazana u nekoliko studija, cilj ove doktorske disertacije je bio da se na molekulskom nivou ispituju promene u signalnom putu neurotrofina koje nastaju u kori i talamusu postnatalnih pacova nakon primene anestetske doze propofola, kao i da se utvrdi potencijal tretmana da indukuje ćelijsku smrt i/ili promene u sinaptičkoj plastičnosti.

Nakon jednokratne primene propofola (25 mg/kg i.p.) ispitana je vremenska i prostorna ekspresija neurotrofina BDNF i NGF, njihovih aktiviranih receptora TrkB, TrkA i p75 receptora, kao i nishodnih kinaza Akt i ERK kod 14 dana starih (PND14) pacova. Ispitan je i potencijal propofolskog tretman da indukuje ćelijsku smrt, praćenjem ekspresije TNF- $\alpha$ , TNFR1, aktivnog fragmenta kaspaze-3, njegovog inhibitora XIAP proteina, kao i transkripcionog faktora NF $\kappa$ B. Finalno je ispitivan potencijal propofolskog tretmana da indukuje promene u ekspresiji markera sinaptičke plastičnosti (MAP-2, drebrina, GAP-43, sinaptofizina, sinukleina-1 i N-kadherina). Promene su praćene u kori i talamusu kao primarnim ciljevima dejstva anestetskog delovanja. Primenom sledećih metoda Western blot analize, RT- i PCR-a u realnom

vremenu ispitivane su promene u ekspresiji ciljnih proteina i iRNK, a primenom Fluoro-žad B histološkog bojenja analizirana je pojava neurona u degeneraciji.

Dobijeni rezultati su pokazali da je propofolski tretman doveo do značajnih promena u nivoima ispitivanih neurotrofina, njihovih receptora i nishodnih efektorskih kinaza. Ove promene nisu povezane sa povećanom neurodegeneracijom ni u kori, ni u talamusu, ali su detektovane značajne promene u zastupljenosti ispitivanih markera sinaptičke plastičnosti. Naši podaci pokazuju da je ekspresija neurotrofina BDNF i NGF različito regulisana u odgovoru na propofolski tretman i da se najznačajnije promene u PND14 mozgu odigravaju preko BDNF signalnog puta i u znatno manjoj meri preko NGF signalnog puta. Smatramo da prekomerna ekspresija BDNF-a u našem eksperimentalnom modelu nije isključivo ograničena na neuronalno preživljavanje, već i na određene aspekte sinaptičke plastičnosti. Pored promene u ekspresiji neurotrofina, propofolski tretman je indukovao promene u ekspresiji Akt i ERK kinaza na regionalno-specifičan način. Fluoro-žad B histoheмиjsko bojenje nije pokazalo neuronalnu degeneraciju, uprkos prolaznom povećanju u ekspresiji aktivnog fragmenta kaspaze-3. Detektovane su značajne regionalno-specifične promene u ekspresiji markera sinaptičke plastičnosti nakon propofolskog tretmana.

Možemo zaključiti da opšti anestetik propofol ispoljava kompleksne efekte na neurotrofine i njihove nishodne signalne puteve u mozgu pacova tokom ranog postnatalnog razvića. Dobijeni rezultati ukazuju da u mozgu PND14 životinja aktivacija Akt i ERK signalnih puteva predstavlja važan aspekt endogenih odbrambenih mehanizama kojim se mladi mozak štiti od potencijalnih neželjenih efekata izazvanih jednokratnom primenom propofola. Balansirana ekspresija ove dve kinaze u istom regionu mozga je važna za odgovarajući izlazni signal i povoljan fiziološki ishod. Preciznije razjašnjenje molekulskih mehanizama koji se pokreću nakon izlaganja mladih eksperimentalnih životinja opštoj anesteziji može pomoći u boljem razumevanju starosno-zavisne komponente neurotoksičnosti i neuroplastičnosti koje izaziva primena opštih anestetika u kliničkoj pedijatriji.

**KLJUČNE REČI:** propofol, kora, talamus, rano postnatalno razviće, signalni put neurotrofina, neuroapoptoza, sinaptička plastičnost

**NAUČNA OBLAST:** Biologija

**UŽA NAUČNA OBLAST:** Molekularna neurobiologija

**UDK BROJ:** 599.323-148.11:577.112]:615.211

## ABSTRACT

### **Propofol-induced changes in neurotrophic signaling in 14-day-old rat forebrain**

The neurotrophins are a family of secreted proteins that mediate numerous functions in both the developing and mature nervous system, including growth, survival, differentiation and synaptic plasticity of postmitotic neurons. The binding of neurotrophins (BDNF, NGF) to Trk receptors induces their dimerization which is followed by autophosphorylation of tyrosine residues within the intracellular kinase domain, that leads to the activation of signaling pathways such as the PI3K/Akt and MAPK/ERK pathways. Akt and ERK kinases play a crucial role in regulating various processes in the brain, including neuronal proliferation, differentiation, development, migration, survival and long-term synaptic plasticity. Phosphorylated Akt can protect cells from apoptosis via stimulation of the expression of proteins that favor cell survival and by inhibiting executor caspases. Activation of ERK1/2 generally promotes cell survival, although under certain conditions, ERK1/2 can possess proapoptotic properties. Since several studies have revealed a role for neurotrophins in anesthesia-induced neurotoxicity in the developing brain, the goal of this study was to explore the potential of anesthetic dose of propofol to influence neurotrophic signaling pathway in the cortex and thalamus of 14-day-old (PND14) rats, and also to investigate whether same treatment is able to induce neurodegeneration and/or changes in synaptic plasticity.

In this study we monitored the spatial and temporal expression of neurotrophic signaling molecules (BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75, Akt and ERK) in the brain of PND14 Wistar rats after the application of a single propofol dose (25 mg/kg i.p). The potential of propofol treatment to induce cell death was also examined, following the expression of TNF- $\alpha$ , TNFR1, cleaved caspase-3 fragment, XIAP and NF $\kappa$ B. Finally, we investigated the changes in the markers of synaptic plasticity (MAP-2, drebrin, GAP-43, synaptophysin, synuclein-1 and N-cadherin) after the propofol treatment. The structures of interest were the cortex and thalamus as the primary areas of anesthetic actions. Changes of the levels of mRNA and proteins of interest were assessed by RT-



or Real Time PCR and Western immunoblot analysis at different time points during the first 24 h after the treatment. Fluoro-Jade B staining was used to follow the appearance of degenerating neurons.

The obtained results show that the treatment caused marked alterations in levels of the examined neurotrophins, their receptors and downstream effector kinases. These changes were not associated with increased neurodegeneration in either the cortex or the thalamus, however significant changes in the expression of synaptic plasticity markers was observed. Our results show that the expression of BDNF and NGF is differentially regulated after propofol treatment. We consider that BDNF overexpression in our experimental model is not strictly limited on neuronal survival, but also on some specific aspects of synaptic plasticity. Propofol treatment induced region-specific changes in the expression of Akt and ERK kinases. These results indicate that in the brain of PND14 rats, the interaction between Akt/ERK signaling might be one of important part of endogenous defense mechanisms which the developing brain utilizes to protect itself from potential anesthesia-induced damage. Even though the expression of cleaved caspase-3 fragment was detected in both examined structures, Fluoro-Jade B staining did not reveal neurodegeneration. Nevertheless, significant region-specific changes in the expression of synaptic plasticity markers was observed. We can conclude that general anesthetic propofol exerts complex effects on neurotrophic signaling pathways in the postnatal rat brain. Together, our results contribute towards an improved understanding of the age-dependent component of anesthesia-induced neurotoxicity and neuroplasticity; they also bare potential clinical implications.

**KEY WORDS:** propofol, cortex, thalamus, postnatal development, neurotrophic signaling pathway, neuroapoptosis, synaptic plasticity

**RESEARCH AREA:** Biology

**RESEARCH FIELD:** Molecular Neurobiology

**UDC NUMBER:** 599.323-148.11:577.112]:615.211

## SKRAĆENICE

**BDNF** (*engl.* Brain-Derived Neurotrophic Factor)- moždani neurotrofinski faktor

**BIR** (*engl.* Baculovirus IAP Repeat)- bakulovirusni ponovak

**CNS** (*engl.* Central Nervous System)- centralni nervni sistem

**CPE** (*engl.* Carboxypeptidase E )- karboksipetidaza P

**CRD** (*engl.* Cysteine-Rich Domains)- domeni bogati cisteinom

**DD** (*engl.* Death Domain)- domen smrti

**Drebrin** (*engl.* Developmentally Regulated Brain Protein)- moždani protein koji je razvojno regulisan

**EPSC** (*engl.* Excitatory Postsynaptic Current)- ekscitatorna postsinaptička struja

**ERK** (*engl.* Extracellular signal-Regulated Kinases)- kinaze čija je aktivnost regulisana vanćelijskim signalima

**FADD** (*engl.* FAS-Associating Protein with Death Domain)- protein sa domenom smrti koji se pridružuje Fas receptoru

**GABA** (*engl.*  $\gamma$ -Aminobutyric Acid)-  $\gamma$ -aminobuterna kiselina

**GAP-43** (*engl.* Growth-Associated Protein-43)- protein povezan sa rastom

**GAPDH** (*engl.* Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)- gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza

**IAP** (*engl.* Inhibitors of Apoptosis Protein)- inhibitori apoptotskih proteina

**IKK** (*engl.* I $\kappa$ B Kinase)- I $\kappa$ B kinaza

**IP3** (*engl.* Inositol trisphosphate)- inozitol 1,4,5,-trifosfat

**I $\kappa$ B** (*engl.* inhibitor of NF $\kappa$ B)- inhibitorna subjedinica NF $\kappa$ B

**JNK** (*engl.* C-Jun N-terminal Kinase)- c-Jun N-terminalna kinaza

**MAP** (*engl.* Microtubule-Associated Proteins)- proteini vezani za mikrotubule

**MAPK** (*engl.* Mitogen-Activated Protein Kinases)- mitogenom aktivirana protein kinaza

**MMP** (*engl.* Matrix Metalloproteinases)- matriksne metaloproteaze

**nACh** (*engl.* Nicotinic Acetylcholine)- nikotin acetilholin

**NF $\kappa$ B** (*engl.* Nuclear Factor kappa B)- nuklearni faktor  $\kappa$ B

**NGF** (*engl.* Nerve Growth Factor)- nervni faktor rasta

**NIK** (*engl.* NF $\kappa$ B-inducing kinase)- kinaza koja indukuje NF $\kappa$ B

**NMDA** (*engl.* N-methyl-D-aspartate)- N-metil-D-aspartat

**NT-3** (*engl.* Neurotrophin-3)- neurotrofin-3

**p75NTR** (*engl.* p75 Neurotrophin Receptor)- p75 neurotrofinski receptor

**PBS** (*engl.* Phosphate-Buffered Saline)- fosfatni pufer

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

**PDK** (*engl.* Phosphoinositide-Dependent Kinase)- fosfoinozimid-zavisna kinaza

**PI3K** (*engl.* Phosphatidylinositol 3-kinase)- fosfatidilinozitol 3-kinaza

**PKB** (*engl.* Protein Kinase B)- protein kinaza B

**PKC** (*engl.* Protein Kinase C)- protein kinaza C

**PLC** (*engl.* Phospholipase C)- fosfolipaza C

**PND** (*engl.* Postnatal Day)- postnatalni dan

**PSD-95** (*engl.* Postsynaptic Density Marker)- marker postsinaptičke gustine-95

**RQ-PCR** (*engl.* Relative Quantification Polymerase Chain Reaction)- RT-PCR u realnom vremenu

**RT** (*engl.* Reverse Transcription)- reverzna transkripcija

**SOD** (*engl.* Superoxide dismutase)- superoksid dismutaza

**TACE** (*engl.* TNF- $\alpha$  Converting Enzyme)- TNF- $\alpha$  konvertujući enzim

**TNF** (*engl.* Tumor Necrosis Factor)- faktor nekroze tumora

**TNFR** (*engl.* Tumor Necrosis Factor Receptor)- receptor faktora nekroze tumora

**tPA** (*engl.* Tissue Plasminogen Activator)- aktivator tkivnog plazminogena

**TRADD** (*engl.* TNFR1-associated death domain)- domen smrti vezan za TNFR1

**TRAF** (*engl.* TNFR-Associated Factor)- faktor pridružen TNF receptoru

**TRAIL** (*engl.* TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)- TNF-u sličan ligand koji indukuje apoptozu

**Trk** (*engl.* Tropomyosin receptor kinase)- tropomiozin kinazni receptori

**XIAP** (*engl.* X-linked inhibitor of apoptosis protein)- X-vezani inhibitor apoptotskih proteina

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Opšta anestezija</b> .....	1
1.1.1. Molekularni mehanizmi delovanja opštih anestetika.....	2
1.1.2. Integrirani model bihejvioralnih efekata anestezije.....	3
<b>1.2. Propofol</b> .....	5
1.2.1. Delovanje propofola na receptorske sisteme.....	6
<b>1.3. Neurotoksično dejstvo anestetika</b> .....	8
1.3.1. Period intenzivne osetljivosti na neurotoksično dejstvo anestetika.....	9
<b>1.4. Uticaj anestetika na signalne puteve</b> .....	10
1.4.1. Signalni put neurotrofina.....	10
1.4.1.1. NGF.....	13
1.4.1.2. BDNF.....	15
1.4.1.3. Receptori za neurotrofine.....	16
1.4.1.3.1. TrkA receptor.....	16
1.4.1.3.2. TrkB receptor.....	17
1.4.1.3.3. p75NTR.....	18
1.4.1.4. Akt kinaze.....	19
1.4.1.5. ERK kinaze.....	21
1.4.2. Signalni put ćelijske smrti.....	23
1.4.2.1. TNF i TNFR1.....	23
1.4.2.2. Kaspaza-3.....	25
1.4.2.3. XIAP.....	27
1.4.2.4. NFκB.....	27
<b>1.5. Sinaptička plastičnost</b> .....	29
1.5.1. MAP-2.....	30
1.5.2. Drebrin.....	30
1.5.3. GAP-43.....	31
1.5.4. Sinaptofizin.....	32
1.5.5. Sinuklein-1.....	33
1.5.6. N-kadherin.....	34
<b>2. CILJEVI RADA</b> .....	37
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	38
<b>3.1. Etička izjava</b> .....	38
<b>3.2. Eksperimentalne životinje i tretman</b> .....	38
<b>3.3. Odabir doze propofola i procena stanja anestezije</b> .....	38
<b>3.4. Starosno-zavisni efekat odabrane doze propofola</b> .....	39
<b>3.5. Eksperimentalna procedura</b> .....	39
<b>3.6. Izolacija tkiva</b> .....	40
<b>3.7. Izolacija RNK i PCR analiza</b> .....	40
3.7.1. Izolacija RNK.....	40
3.7.2. Određivanje koncentracije i provera kvaliteta RNK.....	41
3.7.3. DNA-zni tretman.....	42
3.7.4. Reakcija reverzne transkripcije i semikvantitativni PCR.....	42
3.7.5. Analiza i kvantifikacija PCR produkata.....	44
3.7.6. Reakcija reverzne transkripcije i RT-PCR u realnom vremenu.....	45
<b>3.8. Izolacija proteina i Western blot analiza</b> .....	47

3.8.1. Izolacija proteina.....	47
3.8.2. Određivanje koncentracije proteina.....	47
3.8.3. Elektroforeza proteina.....	48
3.8.4. Prenos proteina sa SDS-poliakriamidnog gela na nitroceluloznu membranu.....	48
3.8.5. Imunološka detekcija imobilizovanih proteina.....	49
3.8.6. Semikvantitativna analiza imunoblotova.....	50
<b>3.9. Fluoro-žad B i Hoechst 33258 histohemijska bojenja i analiza signala.</b>	<b>51</b>
<b>3.10. Statistička obrada podataka.....</b>	<b>52</b>
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>53</b>
<b>4.1. Dozno- i starosno-zavisne studije .....</b>	<b>53</b>
4.1.1. Dozno-zavisna studija .....	53
4.1.2. Starosno-zavisna studija .....	54
<b>4.2. Uticaj propofolskog tretmana na signalni put neurotrofina u kori i talamusu PND14 pacova .....</b>	<b>54</b>
4.2.1. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju ukupne iRNK za BDNF u kori i talamusu PND14 pacova .....	54
4.2.2. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju proBDNF proteina u kori i talamusu PND14 pacova .....	55
4.2.3. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju zrelog BDNF proteina u kori i talamusu PND14 pacova .....	56
4.2.4. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju fosforilisanog TrkB proteina u kori i talamusu PND14 pacova .....	58
4.2.5. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju jezgra fosforilisanog TrkB proteina u kori PND14 pacova .....	59
4.2.6. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju ukupnog TrkB proteina u kori i talamusu PND14 pacova .....	60
4.2.7. Uticaj propofolskog tretmana na zastupljenost ukupne iRNK za NGF u kori i talamusu PND14 pacova .....	61
4.2.8. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju proNGF proteina u kori i talamusu PND14 pacova .....	61
4.2.9. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju zrelog NGF proteina u kori i talamusu PND14 pacova .....	62
4.2.10. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju fosforilisanog TrkA proteina u kori i talamusu PND14 pacova .....	63
4.2.11. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju jezgra fosforilisanog TrkA proteina u kori i talamusu PND14 pacova .....	64
4.2.12. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju p75 receptora u kori i talamusu PND14 pacova .....	66
4.2.13. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju ukupnih i fosforilisanih Akt proteina u kori i talamusu PND14 pacova .....	67
4.2.14. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju ukupnih i fosforilisanih ERK1/2 proteina u kori i talamusu PND14 pacova .....	68
<b>4.3. Uticaj propofolskog tretmana na markere inflamacije i apoptoze u kori i talamusu PND14 pacova.....</b>	<b>69</b>
4.3.1. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju iRNK za TNF- $\alpha$ u kori i talamusu PND14 pacova .....	69

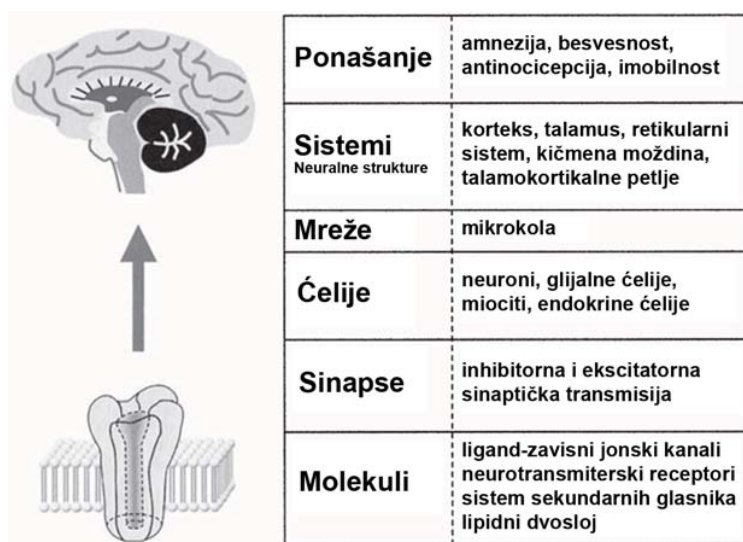
4.3.2. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju iRNK za TNFR1 u kori i talamusu PND14 pacova .....	70
4.3.3. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju aktivnog fragmenta kaspaze-3 u kori i talamusu PND14 pacova .....	71
4.3.4. Detekcija neurodegeneracije Fluoro-žad B i Hoechst bojama u kori i talamusu PND14 pacova nakon propofolskog tretmana .....	72
4.3.5. Detekcija neurodegeneracije Fluoro-žad B i Hoechst bojama u kori i talamusu PND14 pacova nakon različitih doza propofola.....	72
4.3.6. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju XIAP proteina u kori i talamusu PND14 pacova .....	76
4.3.7. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju NFκB p65 proteina u kori i talamusu PND14 pacova .....	77
<b>4.4. Uticaj propofolskog tretmana na markere plastičnosti neuronalnih ćelija u kori i talamusu PND14 pacova .....</b>	<b>78</b>
4.4.1. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju MAP-2 proteina u kori i talamusu PND14 pacova .....	78
4.4.2. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju drebrina u kori i talamusu PND14 pacova .....	79
4.4.3. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju GAP-43 proteina u kori i talamusu PND14 pacova .....	80
4.4.4. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju sinaptofizina u kori i talamusu PND14 pacova .....	82
4.4.5. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju sinukleina-1 u kori i talamusu PND14 pacova .....	83
4.4.6. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju N-kadherina u kori i talamusu PND14 pacova .....	84
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>86</b>
<b>5.1. Dozno- i starosno-zavisni efekti propofola.....</b>	<b>86</b>
<b>5.2. Uticaj propofolskog tretmana na signalni put neurotrofina u kori i talamusu PND14 pacova .....</b>	<b>86</b>
5.2.1. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji BDNF iRNK i proteina u kori i talamusu PND14 pacova.....	86
5.2.2. Propofolski tretman utiče na ekspresiju ukupnog i fosforilisanog TrkB receptora u kori i talamusu PND14 pacova.....	89
5.2.3. Propofolski tretman utiče na ekspresiju NGF iRNK i proteina u kori i talamusu PND14 pacova.....	91
5.2.4. Propofolski tretman povećava ekspresiju fosforilisanog TrkA receptora u kori i talamusu PND14 pacova.....	92
5.2.5. Propofolski tretman povećava ekspresiju p75 receptora u kori i talamusu PND14 pacova.....	94
5.2.6. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji ukupnih i fosforilisanih Akt kinaza u kori i talamusu PND14 pacova .....	95
5.2.7. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji ukupnih i fosforilisanih ERK1/2 kinaza u kori i talamusu PND14 pacova .....	96

<b>5.3. Uticaj propofolskog tretmana na markere inflamacije i apoptoze u kori i talamusu PND14 pacova .....</b>	<b>98</b>
5.3.1. Propofolski tretman povećava ekspresiju iRNK za TNF- $\alpha$ i TNFR1 u kori i talamusu PND14 pacova.....	99
5.3.2. Propofolski tretman povećava ekspresiju aktivnog fragmenta kaspaze-3, ali i njegovog inhibitora XIAP proteina u kori i talamusu PND14 pacova .....	99
5.3.3. Propofolski tretman ne utiče na broj Fluoro-žad B pozitivnih ćelija u kori i talamusu PND14 pacova .....	101
5.3.4. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji NF $\kappa$ B p65 proteina u kori i talamusu PND14 pacova.....	101
<b>5.4. Uticaj propofolskog tretmana na markere plastičnosti neurona.....</b>	<b>102</b>
5.4.1. Regulacija sinaptičke plastičnosti putem neurotrofina.....	103
5.4.2. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji markera plastičnosti dendrita (proteina MAP-2 i drebrina) u kori i talamusu PND14 pacova .....	104
5.4.3. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji GAP-43 proteina u kori i talamusu PND14 pacova....	107
5.4.4. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji sinaptofizina u kori i talamusu PND14 pacova.....	109
5.4.5. Propofolski tretman povećava ekspresiju sinukleina-1 u kori i talamusu PND14 pacova .....	110
5.4.6. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji N-kadherina u kori i talamusu PND14 pacova .....	111
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>113</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>116</b>

## 1. UVOD

### 1.1. Opšta anestezija

Opšta anestezija je prvi put uvedena u kliničku medicinu pre više od 160 godina. Procenjuje se da godišnje preko milion pacijenata podleže opštoj anesteziji u hirurškim i drugim medicinskim zahvatima. Stanje opšte anestezije podrazumeva čitav spektar događaja, od molekula do ponašanja (slika 1). Na molekularnom nivou, opšti anestetici deluju na veliki broj neuronskih membranskih proteina koji funkcionišu kao jonski kanali i neurotransmiterski receptori (Hemmings i saradnici, 2005). Ove interakcije mogu dovesti do strukturnih i dinamičkih izmena, kao što su konformacione promene ciljnih proteina, stabilizacija i održavanje vezanih subjedonica, pomeranje ravnoteže ili kompeticija sa endogenim ligandima (Eckenhoff i Johansson, 1997). S obzirom na to da još uvek nije poznato na koji način se interakcije na molekularnom nivou prenose na klinički vidljive efekte u ponašanju, veoma je važno da se detaljno istraži na koji način međusobno delovanje svih ovih različitih organizacionih nivoa ima za posledicu nastanak anestetskog stanja.



Slika 1: Potencijalni efektori delovanja anestezije na različitim biološkim organizacionim nivoima. Preuzeto i modifikovano iz Ishizawa, 2007.



### 1.1.1. Molekularni mehanizmi delovanja opštih anestetika

Hipnotičke/sedativne supstance, koje se često koriste za uvođenje ili održavanje opšte anestezije, indukuju dozno-zavisan spektar depresije centralnog nervnog sistema (CNS), od sedacije do duboke opšte anestezije. Iako se opšta anestezija smatra jednim od najvažnijih otkrića u modernoj medicini, postavlja se veliki broj pitanja u vezi ostvarivanja efekata opštih anestetika, tj. na kojim mestima i na koji način opšta anestezija deluje u jednom organizmu. Za opšte anestetike se dugo smatralo da predstavljaju biohemijski aktivne supstance koje se ne vezuju za receptore, već prolaze kroz lipidni dvosloj ćelijske membrane, međutim ovaj stav je uveliko napušten. Danas se smatra da na molekularnom nivou opšti anestetici mogu ispoljiti svoje delovanje vezivanjem za ligand-zavisne jonske kanale, receptore vezane za G proteine ili membranske pore za  $K^+$  (Ishizawa, 2007).

Opšti anestetici, u klinički efektivnim koncentracijama, deluju kao pozitivni ili negativni modulatori ligand-zavisnih jonskih kanala. Mnogi inhalacioni anestetici (izofluran, sevofluran, dezfluran i enfluran) pojačavaju funkciju  $GABA_A$  receptora (*engl.* gamma-aminobutyric acid) (Krasowski i Harrison, 1999). Većina intravenskih anestetika, kao što su propofol i etiomidat, se direktno vezuju za  $GABA_A$  receptor i pojačavaju otvaranje jonskog hlornog kanala receptora od strane GABA neurotransmitera (Tomlin i saradnici, 1998; Hales i Lambert, 1991). Neki intravenski anestetici pri višim koncentracijama dovode do otvaranja  $GABA_A$  receptora u odsustvu GABA neurotransmitera. Molekularni mehanizam anestetskog delovanja se ogleda u vezivanju anestetika u šupljini između drugog i trećeg transmembranskog segmenta (TM2 i TM3), što potiskuje vezanu vodu i tako stabilizuje aktivirano stanje receptora (Williams i Akabas, 1999; Trudell i Harris, 2004).

Danas je poznato da  $GABA_A$  receptori regulišu procese budnosti, pamćenja i tenzije mišića, a promene u GABA transmitterskom sistemu odgovorne su i za neke poremećaje raspoloženja u anksioznosti. GABAergički neuroni su raspoređeni širom CNS-a i smatra se da imaju važnu neuromodulatornu ulogu u brojnim strukturama mozga kao što su kora, talamus, hipokampus i produžena moždina (Mody i Pearce, 2004).  $GABA_A$  receptori indukuju brze sinaptičke inhibicije tako što stvaraju prolazne inhibitorne postsinaptičke struje. Pored ove fazične inhibicije, postoji i tonična

inhibicija ili dugotrajna inhibitorna provodljivost koja uključuje aktivaciju vansinaptičkih GABA<sub>A</sub> receptora (Semyanov i saradnici, 2004). Vansinaptički GABA<sub>A</sub> receptori imaju različite farmakološke i kinetičke odlike u poređenju sa sinaptičkim GABA<sub>A</sub> receptorima. Ovi receptori su tonički izloženi niskim GABA koncentracijama (u kojima je potencirajući efekat anestetika najznačajniji), imaju visok afinitet za GABA i pokazuju sporu desenzitizaciju. Smatra se da upravo ovi receptori mogu da doprinesu neurodepresivnim odlikama opštih anestetika (Semyanov i saradnici, 2004).

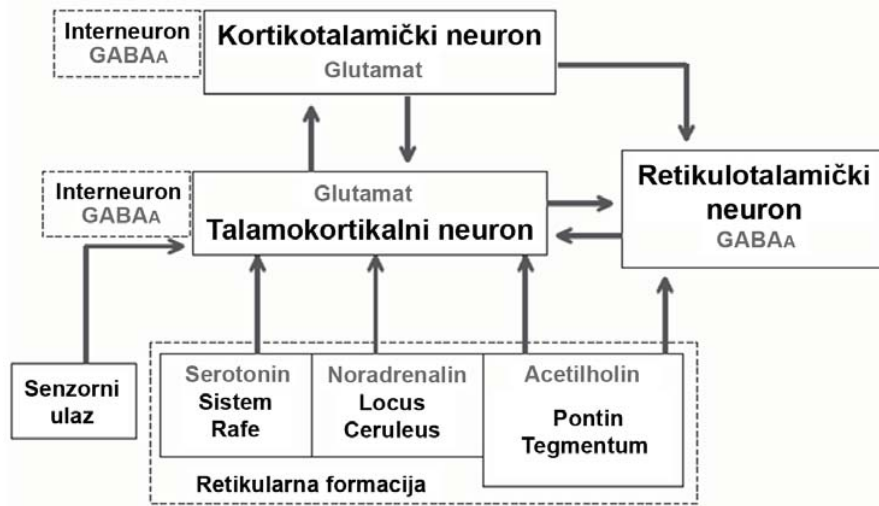
Takođe je poznato da klinički anestetici, kao što su azot oksid, ksenon, ciklopropan i ketamin slabo deluju na GABA<sub>A</sub> receptore. Ovi anestetici ispoljavaju svoje dejstvo inhibiranjem ekscitatorne sinaptičke transmisije vezivanjem za N-metil-D-aspartat (NMDA) glutamatne receptore i/ili za nikotin holinske (nACh) receptore (Yamakura i Harris, 2000).

### **1.1.2. Integrisani model bihevioralnih efekata anestezije**

Opštu anesteziju odlikuje nekoliko jedinstvenih kliničkih aspekata koje su određene bihevioralnim promenama kao što su: reverzibilni gubitak svesti i amnezija, analgezija (anti-nocicepcija) i nepokretljivost (imobilnost) (Antognini i Carstens, 2002; Urban, 2002). Bez obzira na veliki broj literaturnih podataka o potencijalnim molekulskim ciljevima na koje deluju anestetici i dalje je slabo istraženo na koji način se u CNS-u postižu ovi bihevioralni efekti. Postavlja se pitanje da li opšti anestetici utiču na određene strukture u CNS-u ili dovode do globalnog pada u funkcionalnoj aktivaciji CNS-a? Koje nervne strukture su neophodne za nastanak anestetskog stanja, ako efekat anestezije nije globalan? Da li su efekti anestezije neuron-specifični?

**Gubitak svesti.** Termin anestetik se definiše kao biohemijski aktivna supstanca koja dovodi do reverzibilnog gubitka svesti i senzacija, uključujući i osećaj za bol. Animalne studije su ukazale na učešće nekoliko moždanih struktura koje omogućavaju delovanje anestetika na gubitak svesti. Kora, talamus, hipotalamus, bazalni prednji mozak i moždano stablo se smatraju ključnim strukturama mozga u kontroli svesnog stanja (Sonner i saradnici, 2003) (slika 2). Međutim, zahvaljujući studijama funkcionalnog snimanja mozga i kvantitativne elektroencefalografije (EEG) pokazano je da **talamo-kortikalna petlja** može biti ključna komponenta za nastanak besvesnog

stanja (Arhem i saradnici, 2003). Naprednim kvalitativnim EEG analizama je pokazana značajna uloga talamusa u efektima opšte anestezije, posebno u inhibiciji retikularnog jedra i blokadi kortiko-talamo-kortikalne petlje (John i Prichep, 2005). Pozitronskom emisionom tomografijom (PET) je pokazano da propofol kod ljudi smanjuje regionalnu aktivnost medijalnog talamusa, kao i posteriorne cingulatne i orbitofrontalne kore (Fiset i saradnici, 1999).



Slika 2: Šematski prikaz neurona kore, talamusa i srednjeg mozga, kao i puteva za koje se pretpostavlja da su uključeni u gubitak svesti izazvan anestezijom. Glavni neurotransmiterski sistemi su označeni sivom bojom.

**Amnezija.** Razumevanje mehanizama kojim opšta anestezija deluje na pamćenje i učenje je od velikog značaja za razjašnjavanje reverzibilnog gubitka svesti pod anestezijom. Za proces pamćenja značajno je nekoliko odvojenih sistema u koje spadaju hipokampus i srodne strukture kao što su bademasto jadro, neostrijatum i mali mozak (Squire, 2004). Proces pamćenja takođe obuhvata i obradu podataka u delovima kore vezanim za više kognitivne funkcije. Još uvek je kontraverzno da li memorija može nastati pod opštom anestezijom. U nekoliko humanih studija je pokazano da do učenja i pamćenja može doći tokom opšte anestezije (Ghoneim i Block, 1997), dok je u drugim studijama pokazano da funkcije pamćenja nisu aktivne pod propofolskom ili izofluranskom anestezijom (Kerssens i saradnici, 2005).

**Analgezija i anti-nocicepcija.** Temin analgezija se definiše kao odsustvo senzacije bola bez gubitka svesti, dok se termin anti-nocicepcija koristi da se opiše

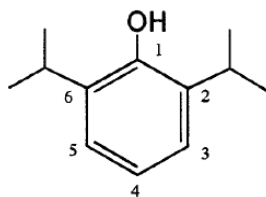
efekat suprimiranja bolnih stimulusa u najširem smislu. Suprimiranje nociceptivnih odgovora se smatra jednim od najbitnijih kliničkih svojstava opštih anestetika. Bolna hirurška stimulacija može izazvati hormonske i metaboličke odgovore koji doprinose postoperativnom morbiditetu i mortalitetu (Desborough, 2000).

**Nepokretnost.** Paralitik (neuromišićni blokirajući agens) je biohemijski aktivna supstanca koja blokira transmisiju na nervno-mišićnom spoju. Ove supstance nemaju anestetska i analgetska svojstva. U nekoliko studija je pokazano da kičmena moždina u najvećoj meri posreduje u sposobnosti opštih anestetika da prouzrokuju imobilnost (Antognini i Carstens, 1998). Takođe je pokazano da je nepokretnost u slaboj korelaciji sa EEG aktivnošću tokom nepodnošljivih stimulusa pod anestezijom, što ukazuje da električna aktivnost kore ne kontroliše motorne odgovore na nepodnošljive stimulse (Rampil i Laster, 1992).

## **1.2. Propofol**

Propofol (2,6-diizopropilfenol) je postao popularan kao agens za indukciju i održavanje anestezije, prvenstveno zbog brzog i kratkog delovanja, kao i usled minimalnih neželjenih dejstava. Anestetske odlike propofola su prvi put prijavljene u januaru 1973. godine od strane Imperial Chemical Industries (ICI) u Velikoj Britaniji (Thompson i Goodale, 2000). Prve kliničke studije su sprovedene u Evropi 1977. godine, kada je korišćen 1% propofol koji je nastao u Cremophor EL (Kay i Rolly, 1977). Međutim, usled visoke incidence anafilakse, propofol u ovoj formi je povučen iz upotrebe (Briggs i saradnici, 1982). U Evropi i Sjedinjenim Američkim Državama su 1983. i 1984. godine izvršena klinička ispitivanja propofola u lipidnoj emulziji čije su anestetske odlike bile slične Cremophore EL formulaciji, ali bez pojave anafilakse (Thompson i Goodale, 2000). Konačno, 1986. godine Food and Drug Administration (FDA) je odobrio upotrebu propofola i ubrzo nakon toga propofol postaje anestetik od izbora. Danas se propofol nalazi u vidu emulzije ulja u vodi, veoma je lipofilan i brzo prolazi krvno-moždanu barijeru što omogućava njegovo brzo delovanje. Oporavak nakon propofola je takođe brz usled intenzivne redistribucije u periferna tkiva, kao i usled metaboličke razgradnje. Slabo se rastvara u vodi. Komercijalno se nalazi u 1% rastvoru Intralipida®.

Propofol ( $C_{12}H_{18}O$ ) je jedinstveno jedinjenje u poređenju sa drugim anestheticima. Sastoji se od fenola za koji su vezane dve izopropil grupe na orto pozicijama do hidroksilne grupe (slika 3). Iako većina anestetika može da se primeni u vidu vodenih soli, propofol ne može, jer je njegova hidroksilna grupa ima  $pK_a=11$ , što vodi ka formiranju soli u rastvorima. Ostatak molekula, čine benzenski prsten i bočne izopropilske grupe koje su veoma lipofilne i zahvaljujući kojima je omogućen brz prolazak propofola kroz krvno-moždanu barijeru.



Slika 3: Strukturna formula propofola, 2,6-diizopropilfenol.

Za razliku od jedinjenja rastvorljivih u vodi, propofol ne može da se eliminiše renalno pre nego što podleže biotransformaciji, i ovaj faktor doprinosi u odloženoj eliminaciji propofola putem hidroksilacije nakon koje sledi konjugacija (glukuronidacija ili sulfacija) (Allegaert i saradnici, 2008). Propofol se brzo metaboliše u jetri konjugacijom sa glukuronidima i sulfatima i pri tom nastaju jedinjenja rastvorljiva u vodi, i 68,3% ovih jedinjenja se ekskretuje urinom u okviru 24h (Guitton i saradnici, 1998). Treba napomenuti da je metabolizam propofola kod neonatusa drugačiji u odnosu na adulte, što se objašnjava različitim stepenom glukuronidacije koja je starosno-zavisna (Allegaert i saradnici, 2007).

### 1.2.1. Delovanje propofola na receptorske sisteme

Kao alkohol, barbiturati ili benzodiazepini, propofol pojačava struju hlora na **GABA<sub>A</sub> receptoru**. U neuronima i rekombinantnim sistemima, potencijacija ovih GABA receptora propofolom se javlja pri niskim koncentracijama, dok se direktna aktivacija receptora pokreće pri visokim, ali klinički relevantnim dozama propofola (Krasowski i Harrison, 1999). Studije na divljim sojevima i mutantnim GABA<sub>A</sub> receptorima eksprimiranim u humanim embrionalnim ćelijama bubrega ukazuju na  $\beta$  subjedinicu ovog receptora kao glavnu odrednicu koja je odgovorna za delovanje

propofola na GABA<sub>A</sub> receptor (Krasowski i saradnici, 1998). Međutim, u nekoliko studija je pokazano da GABA<sub>A</sub> antagonisti kao što su pikrotoksin i gabazin sprečavaju imobilisujuće dejstvo propofola kod adultnih pacova (Sonner i saradnici, 2003), čime se postavilo pitanje da li propofol deluje isključivo na GABA<sub>A</sub> receptore.

Pri suprakliničkim koncentracijama, pokazano je da propofol inhibira aktivnost **NMDA receptora** u hipokampalnim neuronima miša, najverovatnije tako što dovodi do alosteričkih modulacija katjonskih kanala (Orser i saradnici, 1995). Propofol, u koncentracijama koje se mogu uporediti sa klinički relevantnim dozama za održavanje opšte anestezije, inhibira fosforilaciju NR1 sudjedinice NMDA receptora u kulturi pacovskih kortikalnih neurona, što smanjuje funkcionalnost ovog receptora u celini. Na taj način propofol sprečava endogene agoniste NMDA receptora da indukuju unutarćelijski porast kalcijuma (Kingston i saradnici, 2006).

U klinički relevantnim dozama, propofol moduliše i **glicinske receptore** osetljive na strihnin (antagonista glicinskih receptora) (Mascia i saradnici, 1996).

Do danas je zabeleženo nekoliko slučajeva zavisnosti od propofola. Sve droge koje se zloupotrebljavaju pojačavaju aktivnost mezokortiko-limbičkih **dopaminskih neuronskih kola** odgovornih za potkrepljenje (Roy, 2004). Step en aktivacije *in vivo* može se kvantifikovati određivanjem koncentracije oslobođenog dopamina u jedru akumbensa metodom mikrodijalize (Pain i saradnici, 2002). Mehanizam delovanja propofola na porast koncentracije oslobođenog dopamina u jedru akumbensa verovatno se zasniva na presinaptičkoj stimulaciji oslobađanja dopamina. Međutim, visoke doze propofola smanjuju oslobađanje dopamina koje je indukovano električnom stimulacijom jedra akumbensa pacova mehanizmima koji ne zavise od D2, GABA<sub>A</sub> i NMDA receptora (Schulte i saradnici, 2000). U drugoj studiji je pokazano da propofol, u koncentracijama koje su van kliničkog opsega, sprečava preuzimanje dopamina u sinaptosome (Keita i saradnici, 1996). Može se zaključiti da visoke doze propofola povećavaju nivo dopamina u jedru akumbensa tako što izazivaju blokadu u procesu preuzimanja dopamina. Međutim jedna od najalarmantnijih činjenica vezana za zloupotrebu propofola je da prekomerna doza može dovesti do smrti. Od devet poznatih slučajeva o zloupotrebi propofola, četiri su bila fatalna (Roussin i saradnici, 2006).

### 1.3. Neurotoksično dejstvo anestetika

Veliki broj animalnih studija ukazuje da se u mozgu pacova tokom ranog postnatalnog razvića jednokratnim ili višekratnim tretmanom anestheticima, ili kombinacijama anestetika (što je čest slučaj u kliničkoj praksi), mogu indukovati neurodegenerativne promene (Jevtovic-Todorovic i saradnici, 2003; Ikonomidou i saradnici, 2001; Fredriksson i saradnici, 2007). Fenomen programirane ćelijske smrti (apoptoze) je u ovom kontekstu najviše proučavan, što ne znači da i drugi vidovi ćelijske smrti nisu aktivirani pomenutim tretmanima.

Programirana ćelijska smrt ili apoptoza je endogeni program esencijalan za modelovanje organa tokom fetalnog života, a kod adulata omogućava samoobnavljajuće procese i eliminaciju inficiranih ili povređenih ćelija. Tokom normalnog razvića CNS-a, neuroni se formiraju u višku, a zatim sledi eliminacija brojnih neurona koja je kritična za postizanje normalne morfologije i veličine mozga, kao i vijabilnosti organizma. Procenjuje se da tokom normalnog embrionskog razvića mozga oko 50-70% neurona i progenitora podleže fiziološkoj ćelijskoj smrti i eliminaciji putem apoptoze (Oppenheim, 1991; Rakic i Zecevic, 2000). Signalni putevi čijom aktivnošću otpočinju apoptotske promene su grubo podeljeni na spoljašnje (posredovani receptorima smrti) i unutrašnje (mitohondrijalni), mada su oni često isprepletani. Treba naglasiti da je apoptotska ćelijska smrt imperativ prilikom uspostavljanja normalne strukture CNS-a, čemu u prilog idu rezultati eksperimenata koji su pokazali da poremećeni fiziološki apoptotski mehanizmi imaju za posledicu kongenitalne malformacije mozga i odbacivanje embriona (Kuida i saradnici, 1996).

S obzirom na to da je aktivnost GABA i NMDA neurotransmiterskih sistema presudno važna za normalno embrionsko razviće mozga sisara, izlaganje opštim anestheticima u kritičnom periodu potencijalno interferira sa procesima normalnog razvića mozga (Varju i saradnici, 2001; de Lima i saradnici, 2004). Eksperimentalno je pokazano da primena anestetskih doza propofola dovodi do aktivacije kako spoljašnjeg tako i unutrašnjeg apoptotskog puta (Lu i saradnici, 2006; Pešić i saradnici, 2009; Milanović i saradnici, 2010). Međutim, ne indukuju svi GABA<sub>A</sub> agonisti ćelijsku smrt, iako su životinje bile duboko anestetizirane, što ukazuje da jedan od uslova neurotoksičnosti opštih anestetika jeste zadovoljavajući nivo depresije aktivnosti

neurona (Bercker i saradnici, 2009). U cilju dobijanja realnih rezultata treba obratiti pažnju na nekoliko faktora koji mogu da utiču na ishod eksperimenta uključujući starost ispitivane životinje, dužinu trajanja i doze anestetika, kombinovani tretman sa nekoliko različitih anestetika, kao i vremenske tačke od izlaganja anestetiku u kojima je životinja žrtvovana.

### **1.3.1. Period intenzivne osetljivosti na neurotoksično dejstvo anestetika**

Rast i razviće centralnog nervnog sistema sisara uključuju kompleksne ćelijske procese kao što su neurogeneza, diferencijacija u određeni specijalizovani ćelijski podtip, migracija ćelija do njihovog finalnog položaja u okviru CNS-a, sinaptogeneza sa formiranjem veza i mijelinizacija aksona. Ovi procesi se između sisarskih vrsta značajno razlikuju po početku i dužini trajanja. Kod čoveka, sinaptogeneza počinje tokom trećeg trimestra gestacije i razvoj nervnog sistema se nastavlja do 2-3 godine života (Dekaban, 1978). Kod glodara, kao što su miševi i pacovi, nervni sistem je takođe nezreo u trenutku rađanja i nastavlja sa razvićem tokom prvih nedelja postnatalnog života (Dobbing i Sands, 1979). Brojna literatura ukazuje da je period tokom koga nervni sistem sazreva i dobija funkcionalne karakteristike adultnog nervnog sistema ujedno i faza intenzivne osetljivosti na neurotoksične efekte supstanci koje aktiviraju GABA<sub>A</sub> receptore ili blokiraju NMDA receptore. Mada tačan mehanizam kojim opšti anestetici indukuju neuroapoptozu u nezrelom nervnom sistemu nije razjašnjen u potpunosti, osnovna pretpostavka je da anestezijom indukovana depresija neuronalne aktivnosti u periodu sinaptogeneze jeste signal koji je sam po sebi dovoljan za pokretanje apoptotske kaskade u mladim neuronima (Jevtovic-Todorovic, 2005).

Propofol je veoma često anestetik od izbora u pedijatriji. Nakon izveštaja da je petoro dece umrlo od zastoja miokarda nakon dugotrajne propofolske infuzije (Parke i saradnici, 1992) korišćenje propofola u pedijatriskoj anesteziologiji je postalo ograničeno. Međutim, kratkotrajna aplikacija propofola se kod dece i dalje smatra bezbednom. U Sjedinjenim Amerčkim Državama 1999. godine, FDA (Food and Drug Administration) je ograničila uzrast koji može biti tretiran propofolom za održavanje anestezije na 2 meseca, dok je u Nemačkoj upotreba 1% propofola za uvođenje i održavanje anestezije dozvoljena kod dece starije od 1 meseca (Motsch i Roggenbach,



2004). Bez obzira na ova ograničenja, propofol je često anestetik izbora u anesteziologiji, čak kod prerano rođene i novorođene dece.

Treba naglasiti da anestetici ostvaruju toksične uticaje ne samo na neurone, već i na nezrelu oligodendrogliju i astrocite, naročito nakon oksidativne povrede (Back i saradnici, 1998). Nezreli neuroni su takođe podložni ekcitoloksičnim oštećenjima usled povećane aktivacije ligand-zavisnih kalcijumovih kanala (Rao i saradnici, 1997; Chahal i saradnici, 1998; McDonald i saradnici, 1988). Na ovaj način, pojačavanje neurodegenerativne kaskade u nezrelom mozgu, povećava osetljivost neurona na druge metaboličke izazove, kao što su hipoglikemija, hipoksija, ishemija, izlaganje patogenima ili anestheticima (Bhutta i Anand, 2002).

#### **1.4. Uticaj anestetika na signalne puteve**

Smatra se da u nezrelom nervnom sistemu anestetici nepogodno utiču na signalne puteve koji štite neurone od prerane smrti, pa se u tom kontekstu proučavaju signalni putevi neurotrofina. Međutim, neka istraživanja su pokazala da anestetici pogodno utiču na signalne puteve koji vode ćeliju u smrt pa se zato detaljno ispituju promene u citokinima i njihovim signalnim putevima.

##### **1.4.1. Signalni put neurotrofina**

Neurotrofini čine familiju signalnih molekula sa brojnim uticajima na rast, preživljavanje, diferencijaciju i sinaptičku plastičnost postmitotskih neurona, kako u adultnom mozgu, tako i u mozgu tokom razvića (Huang i Reichardt, 2001). U neurotrofine spadaju nervni faktor rasta (*engl.* nerve growth factor, NGF), moždani neurotrofinski faktor (*engl.* brain-derived neurotrophic factor, BDNF), neurotrofin-3 (NT-3), neurotrofin-4/5 (NT-4/5), dok su NT-6 i -7 otkriveni samo kod riba (Huang i Reichardt, 2001). Tokom ranih pedesetih godina prošlog veka NGF je otkriven zahvaljujući trofičkim efektima (podsticanje rasta i preživljavanja) na senzorne i simpatičke neurone (Levi-Montalcini i Hamburger, 1951). BDNF je otkriven 1982. godine kao drugi trofički faktor za koji je pokazano da promoviše preživljavanje jedne

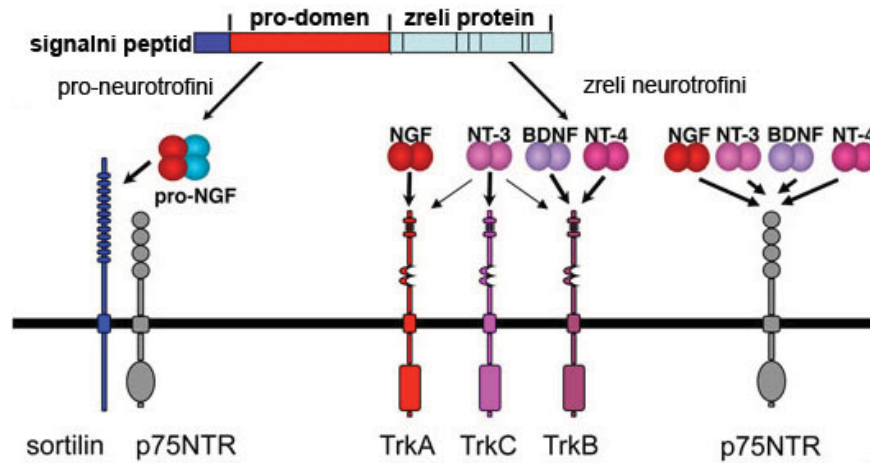
populacije neurona iz ganglije dorzalnog korena kičmene moždine (Barde i saradnici, 1982).

Neurotrofini se sintetišu u vidu preproneurotrofinskih prekursora od oko 25-32 kDa, koji se kasnije obrađuju u okviru unutarćelijskog transportnog puta proteina (Lessmann i saradnici, 2003). Prepeptidi služe kao signal za translokaciju neurotrofinskih prekursora u lumen endoplazmatskog retikuluma i zatim se isecaju. Novonastali proneurotrofin se dalje obrađuje, propeptid se iseca pomoću različitih enzima i pritom nastaje zreli neurotrofin od 14 kDa (Chao i Bothwell, 2002). Nekoliko matriksnih metaloproteaza (MMP) i plazmin su odgovorni za vanćelijsku obradu proformi neurotrofina (Lee i saradnici, 2001). Plazmin je serin proteaza koja je eksprimirana kao neaktivni zimogen, plazminogen, koji postaje aktivan kada ga iseče tPA (*engl.* tissue plasminogen activator) (Plow i saradnici, 1995). Sa druge strane, furin i specifične prokonvertaze kontrolišu unutarćelijsko isecanje proneurotrofina (Schweigreiter, 2006). Zreli neurotrofini formiraju stabilne homodimere koji se sekretuju i u konstitutivnom i u regulisanom putu, a takođe predstavljaju visokoafinitetne ligande Trk receptorske kinaze (*engl.* tropomyosin-receptor-kinase) (Lessmann i saradnici, 2003).

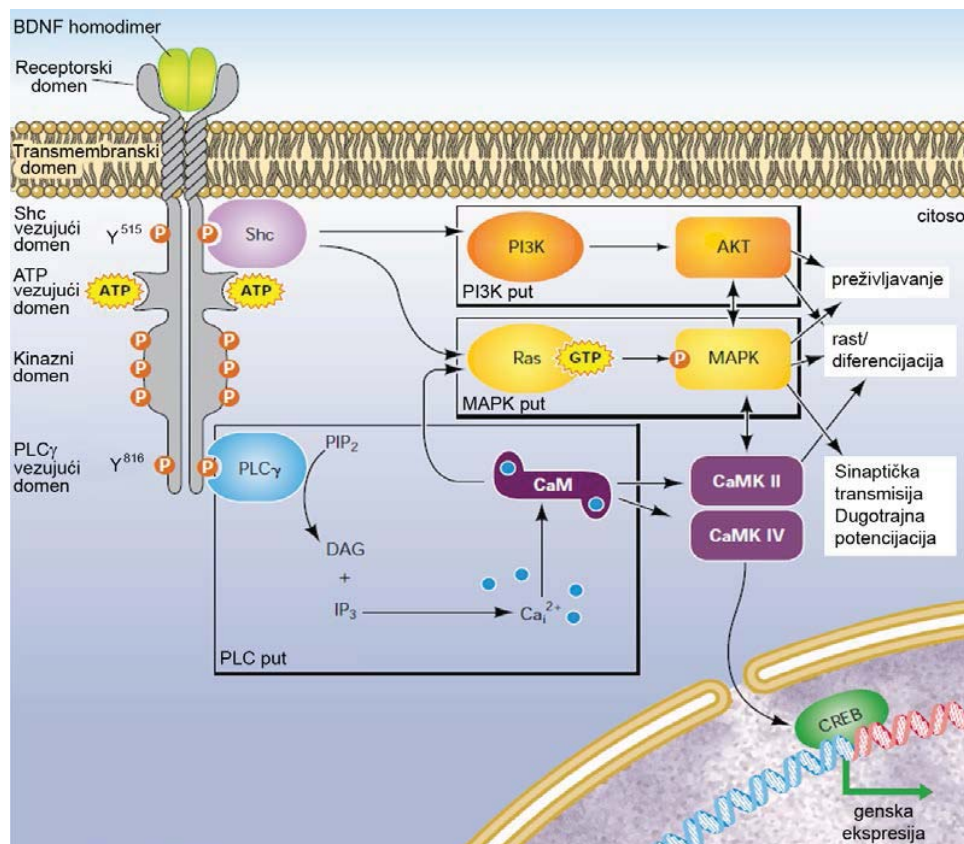
Neurotrofini ostvaruju svoje efekte posredstvom dva tipa membranskih receptora: Trk receptora i p75 neurotrofinskog receptora (*engl.* p75 neurotrophin receptor, p75NTR). Do sada je identifikovano tri tipa Trk receptora koje se karakterišu prema specifičnom afinitetu za različite neurotrofine. NGF se vezuje za TrkA, dok BDNF i NT-4/5 pokazuju visok afinitet vezivanja za TrkB. Sa druge strane, NT-3 predominantno aktivira TrkC, ali se istovremeno može vezati i za TrkB i TrkA, ali sa znatno nižim afinitetom (Barbacid, 1994) (slika 4).

Vezivanje neurotrofina za Trk receptore pokreće dimerizaciju receptora i autofosforilaciju tirozinskih ostataka u unutarćelijskom kinaznom domenu. Nekoliko sekundi do nekoliko minuta nakon vezivanja za receptor, fosforilaciju tirozina prati aktivacija različitih signalnih kaskada, kao što su fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K)/Akt, mitogen-aktivirana protein kinaza (MAPK) i fosfolipaza C (PLC- $\gamma$ ) (slika 5) (Kaplan i Miller, 2000). Ovi unutarćelijski signalni putevi modulišu gensku ekspresiju koja je specifična za određeni ćelijski tip i koja je odgovorna za najveći broj dugotrajnih

efekata neurotrofina koji se odnose na rast, preživljavanje i diferencijaciju neurona (slika 5) (Huang i Reichardt, 2001).



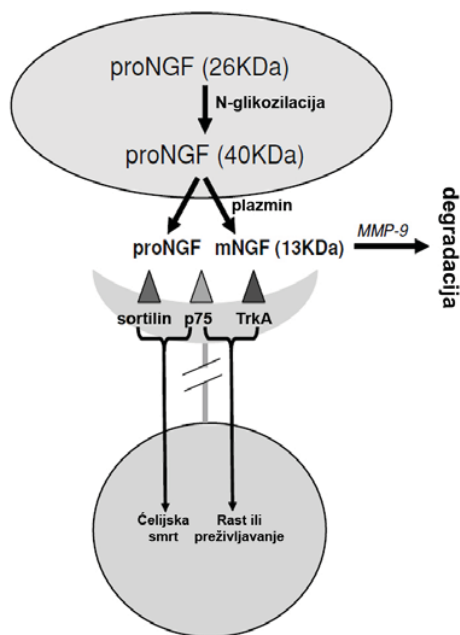
Slika 4: Interakcije pro- i zrelih neurotrofina sa odgovarajućim receptorima.



Slika 5: Signalna kaskada neurotrofina: BDNF homodimer indukuje dimerizaciju i autofosforilaciju TrkB receptora, koja dalje pokreće različite signalne puteve. Preuzeto i modificirano iz Blum i Konnerth, 2005.

### 1.4.1.1. NGF (NT-1)

NGF je otkriven pre skoro pola veka i predstavlja jedan od najbolje okarakterisanih neurotrofina (Levi-Montalcini, 1987). NGF može da se izoluje u velikim količinama iz submandibularnih pljuvačnih žlezda miša (Angeletti i saradnici, 1971), gde se nalazi u kompleksu sa  $\alpha$ -NGF i  $\gamma$ -NGF, dve bliske serin proteaze iz kalikrein familije (u ovom kompleksu, NGF se obeležava kao  $\beta$ -NGF). Dok je  $\gamma$ -NGF veoma specifična i aktivna proteaza koja obrađuje proNGF do zrele forme,  $\alpha$ -NGF je neaktivna i označava se i kao „zaključani zimogen“ (Bax i saradnici, 1997). Pre-proforme NGF-a, koje nastaju od dva alternativno iskrojena transkripta, po uklanjanju signalne pre- sekvence imaju molekulsku težinu od 25 i 32 kDa (Fahnestock i saradnici, 2004a). Post-translacione modifikacije kao što je N-glikozilacija, odvijaju se u Goldži mreži i pri tom nastaje protein od 40 kDa koji se sekretuje (Seidah i saradnici, 1996). Pokazano je da se u kori pacova po stimulaciji nerva, proNGF oslobađa u vanćelijski prostor zajedno sa proteazom koja stvara plazmin (Bruno i Cuello, 2006). Plazmin seče proNGF do zrelog NGF proteina od 14 kDa, koji se vezuje za receptore ili se brzo degradira pomoću metaloproteaza (MMP9) koje se takođe sekretuju po stimulaciji (Slika 6).



Slika 6: Obrada proNGF proteina do zrelog NGF-a. Preuzeto i modifikovano iz Al-Shawi i saradnici, 2007.

Aminokiselinska sekvenca i primarna struktura NGF-a je dobro okarakterisana i ukazuje da je ovaj neurotrofin evolutivno očuvan među različitim vrstama (Barde, 1990). U adultnom mozgu najviši nivo NGF-a detektovan je u hipokampusu, kori i mirisnim kvržicama (Large i saradnici, 1986; Korsching i saradnici, 1985). Najviši nivo NGF-a detektovan je u pljuvačnim žlezdama adultnog mužjaka miša. Nešto niže koncentracije NGF-a su otkrivene u zmijskom otrovu, prostati i semenoj tečnosti zamorca i bikova, u koži ljudi i u brojnim drugim tkivima i telesnim tečnostima (Levi-Montalcini i Angeletti, 1968).

NGF je kritičan trofički faktor, neophodan tokom razvika za rast i preživljavanje simpatičkih neurona, kao i neurona CNS-a (Levi-Montalcini i Angeletti, 1968). Transgeni miševi koji nemaju NGF (Crowley i saradnici, 1994) ili TrkA (Smeyne i saradnici, 1994) pokazuju deficit u funkcionisanju senzornog i simpatičkog nervnog sistema i ne preživljavaju dugo nakon rođenja. Brojni su podaci koji pokazuju da neuroni lišeni NGF-a degenerišu (Freeman i saradnici, 2004). Sa druge strane, postoje i kontradiktorni podaci koji tvrde da, za razliku od apsolutne neophodnosti NGF-a tokom razvika, NGF nije neophodan za preživljavanje senzornih neurona ganglije dorzalnog korena kičmene moždine pacova *in vitro* (Lindsay, 1988), iako NGF može imati trofičku ulogu u održavanju homeostaze neurona ili u grananju neurona nakon povrede tkiva (Diamond i saradnici, 1992a; Diamond i saradnici, 1992b). Smatra se da kod adulta NGF primarno ima ulogu posrednika u zapaljenskim i imunskim odgovorima nakon povrede tkiva (Levi-Montalcini i saradnici, 1996).

Za proNGF se dugo smatralo da je isključivo neurotoksičan, međutim danas su poznati i njegovi neurotrofički efekti. Pokazano je da u adultnom mozgu miša, pacova i čoveka proNGF predstavlja predominantnu formu u odnosu na zreli NGF, kao i da je detektovan dvostruki porast proNGF-a u parijetalnoj kori AD pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (Fahnestock i saradnici, 2001). Ovaj porast proNGF-a kod AD pacijenata može da odražava ili ulogu biološki aktivnog proNGF-a u patogenezi AD, ili da ukaže na posttranslacione poremećaje u biosintezi NGF-a koji utiču na smanjenu obradu proNGF-a u zrelu formu. Postoje podaci da proNGF indukuje ćelijsku smrt neurona *in vivo* u odgovoru na povredu ili ekscitotoksičnu leziju (Harrington i saradnici, 2004; Volosin i saradnici, 2006). S druge strane, relativno visoke doze

proNGF-a indukuju izrastanje neurita u neonatalnim simpatičkim neuronima gornje vratne ganglije (Fahnestock i saradnici, 2004b).

#### 1.4.1.2. BDNF (NT-2)

BDNF je široko rasprostranjeni neurotrofin u CNS-u sisara. BDNF gen je kod ljudi mapiran na hromozomu 11p, sastoji se od devet 5' egzona koji imaju pojedinačne promotore i nemaju učešća u kodiranju proteina i jednog 3' egzona (egzon IX) koji kodira BDNF pre-protein (Aid i saradnici, 2007). Kod glodara, iRNK za BDNF se eksprimira tokom celog razvića i različito u adultnim tkivima (Ernfors i saradnici, 1990; Hofer i saradnici, 1990). Ekspresija BDNF iRNK i proteina u mozgu glodara detektuje se tokom embrionalnog razvića i dostiže najviši nivo između 10 i 14 postnatalnog dana, a zatim opada sa starenjem (Aid i saradnici, 2007). Kod adultnih životinja, BDNF je eksprimiran u celom mozgu, sa najvišim nivoima detektovanim u neuronima hipokampusa (Ernfors i saradnici, 1990; Hofer i saradnici, 1990).

BDNF se sintetiše u proformi koja se ili iseca u zreli neurotrofin ili se transportuje do ćelijske membrane i oslobađa. BDNF može da se oslobodi iz ćelije na dva načina, putem konstitutivnog ili regulisanog puta. ProBDNF je prisutan u mnogim regionima CNS-a, uključujući hipokampus, koru, mali mozak, hipotalamus, crnu supstancu, bademasto jedro i kičmenu moždinu (Zhou i saradnici, 2004). Prodomen proBDNF-a interaguje sa sortilinom u Goldži aparatu, čime se usled novostečene konformacije omogućava interakcija sorting motiva, u okviru zrelog BDNF-a, sa karboksipetidazom P (CPE) i na taj način se BDNF sortira za regulisani sekretorni put (Chen i saradnici, 2005; Lu i saradnici, 2005). BDNF protein se tako pakuje u sekretorne vezikule koje su prisutne u aksonskim (presinaptička mesta) i dendritskim (postsinaptička mesta) završecima glutamatnih neurona, iz kojih se neurotrofini oslobađaju na kalcijum-zavisni način (Fawcett i saradnici, 1998).

Zreli BDNF protein podstiče rast i preživljavanje različitih populacija neurona, uključujući i one u ganglijama dorzalnog korena kičmene moždine, hipokampusu, kori i drugim regionima CNS-a (Huang i Reichardt, 2001). *Knockout* BDNF homozigotni (-/-) miševi umiru u 3. nedelji života, dok su heterozigoti (+/-) vijabilni i pokazuju različite fenotipove, uključujući gojaznost (Lyons i saradnici, 1999), smanjenu podložnost

epileptičnim napadima (Kokaia i saradnici, 1995) i narušeno prostorno učenje (Linnarsson i saradnici, 1997). Kod adulta, neurotrofini su važni posrednici plastičnosti neurona koji utiču na rast i remodelovanje aksona i dendrita; takođe utiču na transport i recikliranje membranskih receptora, oslobađanje neurotransmitera, formiranje i funkcionisanje sinapsi (Lu i saradnici, 2005).

### **1.4.1.3. Receptori za neurotrofine**

Neurotrofini svoje različite uloge ostvaruju vezivanjem za dve klase receptora: Trk porodice receptora spregnutih sa enzimskom aktivnošću tirozin kinaze (TrkA, TrkB i TrkC) i p75NTR. Zreli trofini imaju relativno visok afinitet vezivanja za Trk receptore, dok se proneurotrofini sa visokim afinitetom vezuju za p75 receptor.

#### **1.4.1.3.1. TrkA receptor**

TrkA je receptor za koji se sa najvećim afinitetom vezuje NGF. Trofičko delovanje NGF-a u najvećoj meri zavisi od aktivacije TrkA receptora koji se eksprimira u perifernim i centralnim neuronima. NGF-TrkA kompleks aktivira brojne signalne puteve u ćeliji i može se internalizovati i transportovati do ćelijskog tela, gde dovodi do promene u genskoj ekspresiji (Goedert i saradnici, 1981; Delcroix i saradnici, 2003). Fosforilacija na tirozinu 490 (Tyr490) TrkA receptora neophodna je za udruživanje sa proteinom Shc i aktivaciju Ras-MAP kinazne kaskade, dok fosforilacija u okviru katalitičkog domena odražava samu kinaznu aktivnost receptora (Segal i Greenberg, 1996). TrkA je važan tokom razvića i sazrevanja nervnog sistema, jer je pokazano da reguliše proliferaciju prekursorskih ćelija nervnog sistema (Pierotti i Greco, 2006).

Humani TrkA gen kodira protein od 790 amino kiselina i ima vanćelijski N-terminalni domen koji sadrži 13 potencijalnih mesta glikolizacije (Martin-Zanca i saradnici, 1989). Kod različitih životinjskih vrsta, broj mesta glikolizacije u okviru vanćelijskog domena TrkA, -B i -C receptora kreće se od 11 do 15 (Watson i saradnici, 1999).

Čovečji TrkA receptor poseduje 13 potencijalnih mesta za N-glikozilaciju kojima se mogu pridodati različite funkcije slične onima na  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinicama

insulinskog receptora, kao što su orijentacija i usidrenje glikoproteina u plazma membranu, kao i stabilizacija proteinske strukture u cilju pomaganja ili sprečavanja vezivanja liganada (Martin-Zanca i saradnici, 1989). Danas je poznato da je glikozilacija Trk receptora neophodna za odgovarajuću lokalizaciju i aktivnost receptora (Watson i saradnici, 1999).

#### **1.4.1.3.2. TrkB receptor**

TrkB receptori se aktiviraju od strane BDNF i NT-4/5 (Reichardt, 2006). Fosforilacija TrkB na poziciji Tyr785 regrutuje PLC $\gamma$  do receptora (Reichardt, 2006). Za potpunu aktivaciju ovog puta neophodna je translokacija TrkB receptora u lipidne splavove (Pereira i Chao, 2007). PLC $\gamma$  hidrolizuje fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat, čime nastaje diacilglicerol, koji aktivira protein kinazu C (PKC), i inozitol 1,4,5,-trifosfat (IP3) koji oslobađa Ca<sup>2+</sup> iz unutarćelijskih depoa (slika 5). U kulturi granularnih ćelija malog mozga, BDNF-indukovano povećanje nivoa Ca<sup>2+</sup> iz unutarćelijskih depoa i diacilglicerol, nastao radom PLC $\gamma$ , aktiviraju kanale prolaznih receptorskih potencijala tipa TRPC3/6 (*engl. transient receptor potential canonical subfamily 3/6*). Ulazak Ca<sup>2+</sup> kroz ove kanale doprinosi aktivaciji ERK i CREB i aktivaciji signalnih puteva koji vode ka preživljavanju ćelija (Jia i saradnici, 2007), a imaju i ključnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti (Minichiello i saradnici, 2002).

TrkB iRNK i protein su široko rasprostranjeni u mozgu, uključujući koru, hipokampus, strijatum, septalno jedro, crnu supstancu, Purkinje neurone malog mozga, moždano stablo i motoneurone kičmene moždine (Kokaia i saradnici, 1993; Zhou i saradnici, 1993; Muragaki i saradnici, 1995; Fryer i saradnici, 1996; Yan i saradnici, 1997). Ekspresija ovih receptora tokom postnatalnog razvića u mozgu pacova je detaljno istražena. U septumu, strijatumu i moždanom stablu detektovan je viši nivo Trk iRNK u 2. i 4. nedelji nego u 1. postnatalnoj nedelji života; u talamičkim jedrima vezanim za limbički sistem TrkB i TrkC iRNK je visoko ekspimirana u 1. postnatalnoj nedelji života, a zatim opada postepeno od 2. do 4. nedelje života (Ringstedt i saradnici, 1993). Ekspresija TrkB iRNK je starosno-zavisna, tako da je u piriformnoj kori detektovana tek od 2. nedelje života (Ringstedt i saradnici, 1993). Ovi podaci pokazuju da je ekspresija članova Trk familije tačno regulisana tokom razvića.



### 1.4.1.3.3. p75NTR

p75NTR je član superfamilije receptora faktora nekroze tumora (*engl.* tumor necrosis factor receptor, TNFR). Ovu superfamiliju definišu ligand-vezujući regioni sa jednim ili više (najčešće četiri) cisteinom-bogatih domena (*engl.* cysteine-rich domain, CRD), otkrivenih upravo u p75 receptoru (Johnson i saradnici, 1986). p75 je transmembranski protein koji sadrži vanćelijski, transmembranski i unutarćelijski domen (Johnson i saradnici, 1986). U okviru vanćelijskog domena se nalaze domeni bogati cisteinom. Treći i četvrti cisteinski ponovak predstavljaju vezivna mesta za neurotrofine, jer je pokazano da mutantne forme p75 koje nemaju ova dva domena ne mogu da vežu za sebe neurotrofine (Dechant i Barde, 2002).

Ekspresija ovog receptora varira među vrstama i često se menja tokom životnog veka jednog organizma. Na primer, p75 je visoko i široko rasprostranjen tokom razvića i dramatično opada tokom starenja (Chao, 2003). Međutim, p75 može da se re-eksprimira u patološkim stanjima povezanim za masovnom ćelijskom smrću (Chao, 2003).

p75 vezuje sve zrele neurotrofine sa približno istim niskim afinitetom, a pokazano je da ovaj receptor vezuje proneurotrofine sa visokim afinitetom (Lee i saradnici, 2001). p75 takođe može da interaguje i sa brojnim drugim receptorima kao što su Trk receptori, sortilin i Nogo, kao i sa drugim ligandima osim neurotrofina kao što su virus besnila,  $\beta$ -amiloid i prionski peptidi (Schechterson i Bothwell, 2010). Signalni mediatori koji se aktiviraju neposredno po vezivanju liganda za p75 uključuju: ceramide (Dobrowsky i saradnici, 1994), NF $\kappa$ B (Carter i saradnici, 1996), Akt (Roux i saradnici, 2001), JNK (Friedman, 2000), kao i kaspaze (Coulson i saradnici, 2000).

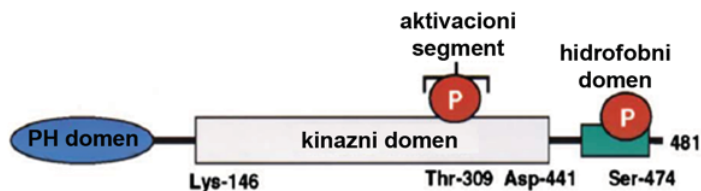
p75 ima mnogobrojne uloge ne samo u nervnom, već i u imunom i vaskularnom sistemu. Ovaj receptor može da indukuje izrastanje neurita i ćelijsko preživljavanje ili ćelijsku smrt u zavisnosti od toga da li deluje samostalno ili je ko-eksprimiran sa Trk receptorima.

#### 1.4.1.4. Akt kinaze

Akt, poznat kao protein kinaza B (PKB), je serin/treonin protein kinaza koja ima veoma važne uloge u signalnim putevima koje modulišu razviće, ćelijsku proliferaciju, migraciju, apoptozu i preživljavanje (Dummler i Hemmings, 2007).

Akt je otkriven 1977. godine u eksperimentima sa transformišućim leukemija virusom (AKT8) kod miševa koji su spontano razvijali limfome sa visokom incidencom (Staal i saradnici, 1977). Do danas su otkrivene tri izoforme PKB/Akt: PKB $\alpha$ /Akt1, PKB $\beta$ /Akt2 i PKB $\gamma$ /Akt3 koje su produkti tri različita gena (Jones i saradnici, 1991; Cheng i saradnici, 1992; Konishi i saradnici, 1995). Akt familija je evolutivno očuvana kod eukariota. Aminokiselinska sličnost između *C. elegans* i ljudi je oko 60%, dok je između miševa, pacova i ljudi sličnost veća od 95%.

Sva tri proteina dele evolutivno očuvanu tercijernu strukturu koja se sastoji od N-terminalnog plekstrin homolognog (PH) domena, kinaznog (katalitičkog) domena i kratkog C-terminalnog regulatornog domena u okviru koga se nalazi hidrofobni domen sa fosforilacionim mestom (Hanada i saradnici, 2004) (slika 7).



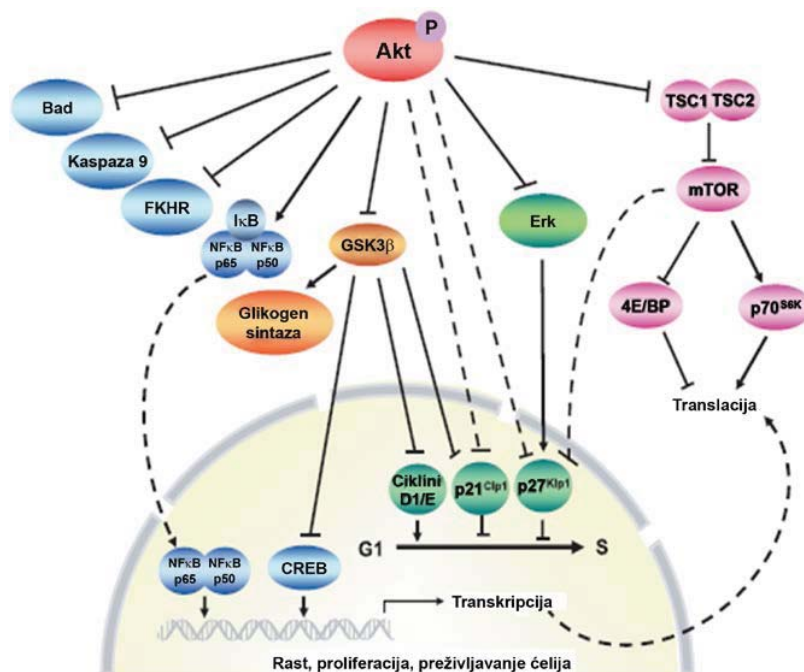
Slika 7: Shematski prikaz tercijerne strukture Akt proteina.

Kod miševa, Akt1 i Akt2 izoforme su široko rasprostranjene u organizmu, dok je najveća ekspresija Akt3 izoforme detektovana u mozgu i testisima. Akt2 iRNK i proteinski nivoi su povišeni u srcu, jetri, skeletnoj muskulaturi i bubrezima, ekspresija Akt2 je značajno niža u mozgu, placenti, plućima i pankreasu (Meier i saradnici, 1997). Iako je aktivnost Akt2 niža nego Akt1, oba enzima pokazuju sličnu supstratnu specifičnost.

Akt kinaza ima dva mesta fosforilacije: Thr308 u aktivacionoj (kinaznoj) petlji i Ser473 u hidrofobnom domenu na C-terminusu (slika 7). Fosforilacija na obe ove pozicije je neophodna za potpunu aktivaciju Akt-a (Alessi i saradnici, 1996). Fosfoinozimid-zavisna kinaza (PDK1) fosforiliše Akt na treoninskom ostatku (Thr309 na

Akt2, koji odgovara Thr308 na Akt1) u okviru aktivacionog segmenta. Glavno mesto fosforilacije je Thr308, koje usled naelektrisanja indukuje promene u konformaciji Akt-a kojim je omogućeno vezivanje za supstrate, a i dolazi do povećane katalize. Nefosforilisana forma Akt-a je praktično neaktivna, a PDK1 fosforilacija stimuliše njegovu aktivnost najmanje 100 puta (Alessi i saradnici, 1996, 1997; Stokoe i saradnici, 1997; Stephens i saradnici, 1998). Druga kinaza, PDK2, fosforiliše Akt2 na poziciji serina 474 (koja odgovara Ser473 na Akt1) koja se nalazi u okviru C-terminalnog hidrofobnog domena. Fosforilacija na Ser474 pojačava aktivnost već fosforilisanog Akt-a (na poziciji Thr309) 7-10 puta (Alessi i saradnici, 1996), tako da fosforilacije na obe pozicije dovode do 1000 puta većeg porasta u protein kinaznoj aktivnosti. Konfokalnom mikroskopijom je pokazano da se aktivacijom Akt translocira u nukleus i to 20 do 30 minuta nakon stimulacije mitogenima (Meier i saradnici, 1997).

Akt je prvobitno otkriven kao slab onkogen, međutim ekspresija ove kinaze u većini ćelija ne dovodi do transformacije (Bellacosa i saradnici, 1991). Zdrave ćelije ne traže zaštitu, jer je njihov genom stabilan i one dobijaju pozitivne signale iz matriksa; samo tumorske ćelije postaju zavisne od hronične Akt aktivnosti. Akt podleže kompleksnim mehanizmima aktivacije koja uključuje fosforilaciju i konformacione promene. U proteinske supstrate Akt kinaze ubraja se nekoliko proapoptotskih proteina, kao i jedna protein serin kinaza koja se naziva GSK-3 (*engl.* glycogen synthase kinase-3) i koja je prvi otkriveni supstrat Akt-a (Cross i saradnici, 1995). GSK-3 deluje na mnoge transkripcione faktore, strukturne proteine i metaboličke enzime (Doble i Woodgett, 2003). Pored GSK, do danas je otkriveno oko 50 Akt supstrata (slika 8).



Slika 8. Ciljni molekuli fosforilisanog Akt proteina. Aktivirane (fosforilisane) Akt izoforme su sposobne da regulišu ključne ćelijske i fiziološke procese tako što fosforilišu široki spektar supstrata uključenih u procese preživljavanja (plavo), metabolizma glukoze (narandžasto), progresije ćelijskog ciklusa (zeleno) i sinteze proteina (roze). Isprekidana linija označava translokacije iz citoplazme u nukleus i obratno.

#### 1.4.1.5. ERK kinaza

ERK kinaze pripadaju familiji mitogenima-aktiviranih protein kinaza (MAPK) i predstavljaju vitalne regulatore signalnih transdukcija koje aktiviraju vanćelijski signali kao što su hormoni, neurotransmiteri i faktori rasta (Seger i Krebs, 1995). Do danas su otkrivene 4 različite MAPK kaskade: ERK (*engl.* extracellular signal-regulated kinase 1/2) (Boulton i saradnici, 1990), JNK (*engl.* c-Jun N-terminal kinase) (Kyriakis i saradnici, 1994), p38MAPK (Lee i saradnici, 1994) i BMK1 (ERK5) kaskada (Zhou i saradnici, 1995).

ERK1 i ERK2 su dve izoforme MAPK koje su otkrivene prvenstveno kao ključni regulatori deobe i diferencijacije. p42-ERK1 i p44-ERK2 su produkti dva različita gena. Ove izoforme se po aminokiselinskoj sekvenci razlikuju samo 17%, tako da imaju visoku sličnost u regulaciji, fosforilaciji supstrata i obrazcu subćelijske lokalizacije (Boulton i Coob, 1991). ERK2 je strukturno slična najvećem broju protein

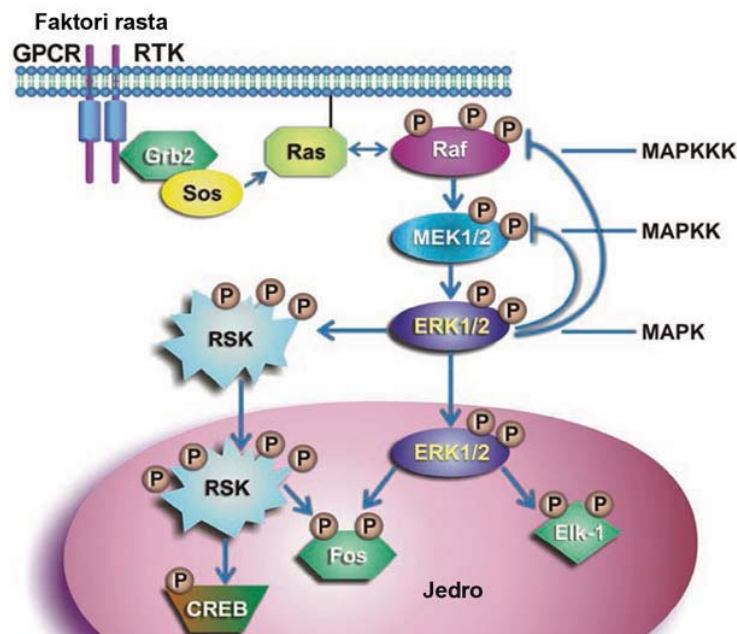
kinaza i sadrži mali N-terminalni domen, katalitički domen i veliki C-terminalni domen (Zhang i saradnici, 1994).

ERK je široko rasprostranjen u CNS-u. Najviši nivoi ERK proteina su detektovani u jedru akumbensa, repatom jedru i putamenu, hipokampusu, čeonj kori (Ortiz i saradnici, 1995). ERK2 je šire rasprostranjen nego ERK1 (Lefloch i saradnici, 2008). ERK1 *knockout* miševi su vijabilni (Pages i saradnici, 1999), dok ERK2 *knockout* miševi ne uspevaju da dovrše embrionsko razviće (Hatano i saradnici, 2003).

ERK signalna kaskada ima važnu ulogu u regulaciji nekoliko ćelijskih procesa, kao što su proliferacija, diferencijacija, razviće, učenje i pamćenje, kao i preživljavanje (Seger i Krebs, 1995). Faktori rasta aktiviraju ovu kaskadu pomoću malih guanozin trifosfat (GTP)-vezujućih proteina (Ras i Rap), koji prenose signal do Raf kinaze u okviru MAP3K nivoa ove kaskade (Kyriakis i saradnici, 1993). Aktivna Raf kinaza dalje fosforiliše MEK1/2 (Kyriakis i saradnici, 1992). Zatim MEK kinaze fosforilišu ERK1 i ERK2 (Payne i saradnici, 1991) (slika 9).

Nefosforilisan ERK2 je slabo aktivan, a fosforilacija na pozicijama Thr183 i Tyr185 dovode do značajnih konformacionih promena koje omogućavaju njegovu aktivaciju (Canagarajah i saradnici, 1997). Potpuno katalitički aktivan ERK je 5-6 puta aktivniji nego nefosforilisan. Intenzitet i trajanje ERK aktivnosti su ključni parametri u specifičnoj odrednici ERK kaskade (Marshall, 1995). Zbog toga su fosfataze koje inaktiviraju ERK, nazvane MKP3 (*engl.* MAPK phosphatase 3) ključne komponente u proceni ćelijskih odgovora na dati stimulus (Aebersold i saradnici, 2004).

ERK1/2 signalna kaskada reaguje na veliki broj vanćelijskih stimulusa. ERK1/2 može da se aktivira prolazno ili trajno. Aktivirani ERK1/2 fosforiliše veliki broj nishodnih supstrata. Do danas je otkriveno preko 150 supstrata u koje spadaju transkripcioni faktori, protein kinaze, protein fosfataze, citoskeletni proteini, receptori, signalni molekuli, apoptotski proteini i mnogi drugi proteini (Yoon i Seger, 2006).



Slika 9: Mehanizmi ERK aktivacije. Preuzeto i modificirano iz Mebratu i Tesfaigzi, 2009.

## 1.4.2. Signalni put ćelijske smrti

### 1.4.2.1. TNF i TNFR1

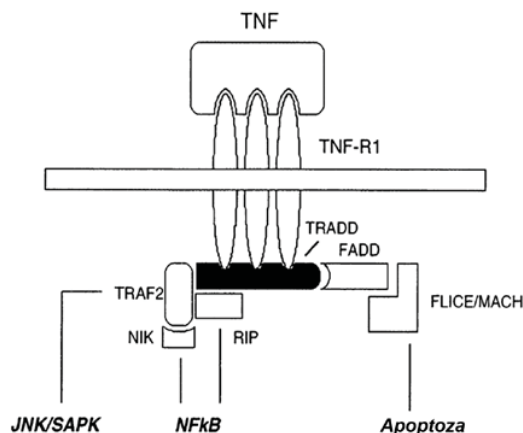
Faktor nekroze tumora (*engl.* tumor necrosis factor, TNF) je plejotropni citokin koji se sintetisuje u fiziološkim odgovorima na infekciju, povredu ili ishemiju. Mikroglija (Sawada i saradnici, 1989), astrociti (Sawada i saradnici, 1989) i ependimske ćelije horoidnog pleksusa (Tarlow i saradnici, 1993) su glavni izvor ovog citokina u CNS-u.

TNF- $\alpha$  nastaje od prekursora, transmembranskog TNF- $\alpha$  (mTNF), koji se eksprimira na površini ćelije kao polipeptid od 233 aminokiseline (26 kDa) (Bazzoni i Beutler, 1996). Nakon obrade od strane metaloproteinaza, kao što je TACE (*engl.* TNF- $\alpha$ -converting enzyme), oslobađa se solubilna forma TNF- $\alpha$  (sTNF) od 157 aminokiselina (17 kDa). Solubilni i transmembranski TNF koegzistiraju kao mono, di ili trimerni proteini, sa tim da su biološki aktivni samo trimerni agregati proteina (Black i saradnici, 1997).

Svoje brojne uloge TNF ostvaruje vezivanjem za dva različita TNF receptora (TNFR1 i TNFR2) koji se nezavisno ekspimiraju u različitim ćelijama uključujući

neurone i glijalne ćelije (Bazzoni i Beutler, 1996). Oba receptora se isecaju na solubilne forme koje su sposobne da vežu i neutrališu TNF. TNFR1 i -R2 se eksprimiraju u skoro svim ćelijama (Vandenabeele i saradnici, 1995). Vanćelijski (ligand-vezujući) domen TNFR1 sadrži četiri CRD ponovka (*engl.* cysteine rich domain) tipična za TNFR superfamiliju (Tuma i saradnici, 1995), dok unutarćelijski domen sadrži domen smrti (*engl.* death domain, DD) blizu C-terminalnog regiona (Tartaglia i saradnici, 1993).

TNF receptori aktiviraju različite unutarćelijske puteve signalne transdukcije koji modulišu različite ćelijske odgovore. Na primer, TNFR1 receptor posreduje u TNF-indukovanoj apoptotskoj ćelijskoj smrti (Smith i saradnici, 1994), dok sa druge strane uloge TNFR2 nisu u potpunosti istražene. Ovaj receptor je uključen u proliferaciju ćelija i protekciju od smrti (Tartaglia i saradnici, 1991), iako je sposoban da prenosi apoptotske signale u određenim ćelijskim linijama (Grell i saradnici, 1993). Oba receptora su sposobna da se vežu za unutarćelijske adapterske proteine sa domenom smrti- TRADD (*engl.* TNFR1-associated death domain) i FADD (*engl.* Fas-associated death domain) ili bez domena smrti- TRAF (*engl.* TNF-receptor associated factor), koji dalje aktiviraju kompleksne unutarćelijske signalne procese koji su posrednici plejotropnih efekata TNF- $\alpha$  (MacEwan, 2002) (slika 10). Signalni putevi u kojima posreduje TNFR1 najčešće vode ćelije u smrt usled aktivacije kompleksa citoprotektivnih odgovora koji zahtevaju prisustvo TRAF2. Prvi signalni put, koji zahteva prisustvo protein kinaze NIK (*engl.* NF $\kappa$ B-inducing kinase) (Malinin i saradnici, 1997), dovodi do fosforilacije I $\kappa$ B (inhibitorne subjedinice NF $\kappa$ B) koja se degraduje i pritom oslobađa NF $\kappa$ B (*engl.* nuclear factor kappa B) koji ulazi u jedro i aktivira transkripciju (Rothe i saradnici, 1995). Drugi put je nezavisan od NIK, aktivira JNK koji zatim stimuliše transkripciju tako što fosforiliše i aktivira brojne transkripcione faktore kao što su c-Jun, ATF2 i Elk. Može se zaključiti da se stimulacija genske ekspresije odvija uglavnom preko TRAF2-zavisnih puteva, za razliku od toga putevi apoptoze zahtevaju FADD (slika 10).



Slika 10: Shematski prikaz signalnih puteva koje pokreće TNFR1. Preuzeto i modifikovano iz Natoli i saradnici, 1998.

### 1.4.2.2. Kaspaza-3

Kaspaze su familija cistein-zavisnih aspartat-specifičnih proteaza (*engl.* cysteine-dependent aspartate-specific proteases) i predstavljaju ključne posrednike programirane ćelijske smrti ili apoptoze. Među njima, kaspaza-3 je najčešće aktivirana proteza u procesu apoptoze, jer katalizuje specifično isecanje mnogih ćelijskih proteina koji su od značaja za ovakav ishod.

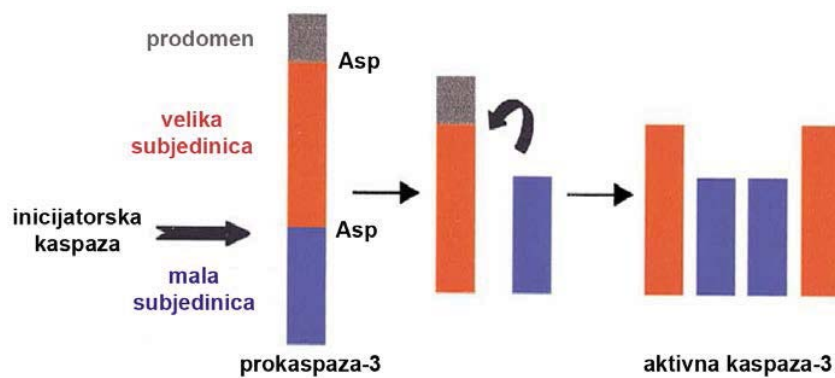
Apoptoza predstavlja kompleks bioloških procesa koji omogućavaju organizmu da ubije i ukloni neželjene ćelije tokom razvića, homeostaze i bolesti (Thompson, 1995). Ovaj proces je prvi put opisan 1972. godine (Kerr i saradnici, 1972) i definisan je kao morfološka promena umiruće ćelije koja uključuje kondenzaciju hromatina, fragmentaciju jedra i smanjenje ćelije na apoptotska tela. Biohemijske odlike vezane za apoptozu uključuju internukleozomalno isecanje DNK, kao i proteolitičko isecanje brojnih unutarćelijskih supstrata (Martin i Green, 1995). Usled promena na ćelijskoj membrani, apoptotske ćelije se fagocitiraju pre nego što stignu da oslobode unutarćelijski sadržaj i na taj način ne dolazi do indukcije zapaljenskih odgovora. Apoptoza je proces u kojem kaspazna kaskada proteolitičkih događaja dovodi do eliminacije oštećenih ili neželjenih ćelija.

Kaspaza-3 ima brojne fiziološke funkcije i neophodna je za normalno razviće mozga i preživljavanje jedinki, čemu u prilog ide podatak da kaspaza-3 *knockout* miševi umiru nekoliko nedelja nakon rođenja (Kuida i saradnici, 1996; Woo et al, 1998). Ovi



miševi imaju specifičan fenotip; njihove lobanje su defektne sa ektopičnim masama ćelija koje se formiraju usled izostanka apoptoze tokom normalnog razvića mozga, ali, iznenađujuće, ne i drugih organa ili tkiva. Na osnovu ovakvih rezultata može se izvesti zaključak da je uloga kaspaze-3 u normalnom razviću tkivno-specifična.

Kaspaze se sintetišu u vidu neaktivnih prekursora (prokaspaza ili zimogena). Prokaspaze sadrže tri domena: N-terminalni prodomen, veliku subjedinicu koja sadrži aktivna mesta i C-terminalnu malu subjedinicu. Kaspaze se aktiviraju do funkcionalnih proteaza tokom dva događaja isecanja. Prvo proteolitičko isecanje deli lanac na malu i veliku kaspaznu subjedinicu, a drugo isecanje uklanja N-terminalni prodomen. Kaspaze su među najspecifičnijim proteazama, sa neophodnim isecanjem nakon aspartata (Asp) (Stennicke i Salvesen, 1998). Isecanje na ovom mestu odvaja prodomen od velike subjedinice, ali i odvaja malu od velike subjedinice. Prisustvo Asp omogućava kaspazama da se auto-aktiviraju ili da budu aktivirane od strane nekih drugih kaspaza u cilju pojačavanja kaspazne kaskade. Aktivna kaspaza tada postaje tetramer koji se sastoji od dve velike i dve male subjedinice sa aktivnim mestima (Slika 11) (Wolf i Green, 1999).



Slika 11: Proces aktivacije prokaspaze-3 do aktivne kaspaze-3. Preuzeto i modifikovano iz Zimmermann i saradnici, 2001.

Iako je do danas identifikovano 14 kaspaza, u ćelijama je najrasprostranjenija kaspaza-3. Jedino je ova proteaza odgovorna za većinu apoptotskih efekata, iako je podržavaju druge dve kaspaze, kaspaza-6 i -7. Zajedno, ove tri egzekutorske kaspaze su uzročnici apoptotskog fenotipa, isecanjem ili degradacijom nekoliko važnih supstrata. Kaspazni supstrati se mogu podeliti u dve kategorije: (1) regulatore apoptoze, koji se isecanjem aktiviraju ili inaktiviraju (Bid, Bcl-2, Bcl-xl, Akt, Raf-1) i (2) konstitutivne ili

strukturne proteine, čije je isecanje neophodno za finalni raspad ćelije (aktin, spektrin, gelsolin) (Nunez et al, 1998).

### 1.4.2.3. XIAP

Pored inicijatora i egzekutora apoptoze, ćelije sadrže i prirodne inhibitore kaspaza. Inhibitori apoptotskih proteina (IAP) su prvi put identifikovani kod bakulovirusa, a kasnije su otkriveni i kod ljudi. Kod sisara najmanje pet različitih IAP ispoljava anti-apoptotsku aktivnost: XIAP (*engl.* X-linked inhibitor of apoptosis protein), c-IAP1, c-IAP2, neuronalni IAP i survivin (Roy i saradnici, 1997; Deveraux i saradnici, 1997; Liston i saradnici, 1996; Tamm i saradnici, 1998). Od svih njih, XIAP ima najširu i najjaču anti-apoptotsku aktivnost. XIAP, c-IAP1 i c-IAP2 su direktni kaspazni inhibitori koji se vezuju i inhibiraju aktivnu kaspazu-3 i -7, kao i prokaspazu-9, ali ne i kaspazu-1, -6, -8 i -10 (Deveraux i saradnici, 1997; Roy i saradnici, 1997).

XIAP sadrži jedan C-terminalni RING (*engl.* really interesting new gene domain) i tri BIR (*engl.* baculovirus IAP repeat) domena koji su odgovorni za anti-kaspaznu aktivnost (Deveraux i saradnici 1997) (slika 12). Osnovna uloga BIR domena je u posredovanju protein-protein interakcija. S obzirom na to da se BIR domeni mogu javiti kao jedan ili više ponovaka u okviru IAP familije, pokazano je da prisustvo većeg broja kopija u molekulu može da poveća afinitet tog proteina, kao i opseg proteina sa kojima će interagovati. BIR-2 i -3 su uključeni u vezivanje kaspaza i apoptotskih regulatornih molekula, a BIR-1 interaguje sa različitim signalnim intermedijerima. Sa druge strane, RING domen ima ulogu u modulaciji ubikvitinazne aktivnosti (Lorick i saradnici, 1999).



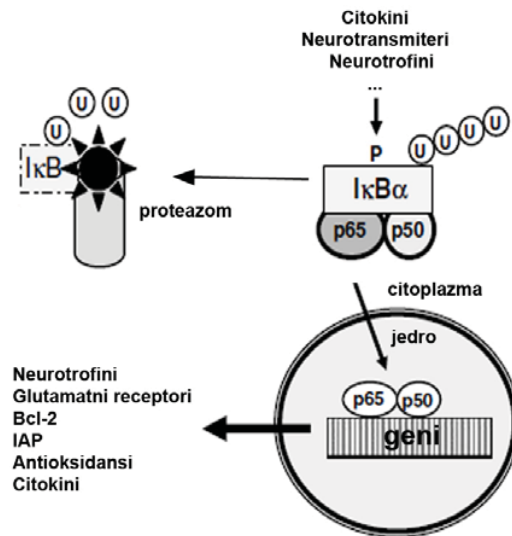
Slika 12: Šematski prikaz humanog XIAP proteina

### 1.4.2.4. NFκB

NFκB je prvobitno identifikovan u limfocitima, kao ključni transkripcioni faktor uključen u regulaciju sinteze citokina (Baeuerle i Baltimore, 1996). Tada je pokazano da

NFκB opstaje u citoplazmi u neaktivnoj formi koja sadrži tri proteinske subjediniice: dimerski transkripcioni faktor i inhibitornu subjedinicu nazvanu IκB. Identifikovano je nekoliko različitih DNK vezujućih subjediniica NFκB uključujući p65 (Rel-A), Rel-B, c-Rel, p50 (nastaje od 105 kDa prekursora) i p52 (nastaje od 100 kDa prekursora). Inhibitorna subjediniica uključuje IκBa, IκBb, IκBg i Bcl-3. U neuronima, najčešće zastupljeni kompleks NFκB se sastoji od p65, p50 i IκBa (Kaltschmidt i Kaltschmidt, 1994). Međutim, u neuronima mogu biti zastupljeni i drugi kompleksi NFκB što zavisi od stadijuma razvića neurona, kao i od njihove lokalizacije u okviru nervnog sistema (Mattson i Meffert, 2006).

Otkriven je veliki broj signala koji aktiviraju NFκB u neuronima kao što su TNF-α, glutamat, neurotrofini i drugi (Barger i saradnici, 1995). Ovi molekuli aktiviraju NFκB preko kinazne kaskade koja se prenosi preko kalcijum/kalmodulin zavisne kinaze II, Akt-a i PKC (Meffert i saradnici, 2003). Mehanizam aktivacije NFκB uključuje fosforilaciju inhibitorne IκB subjediniice pomoću IκB kinaznog kompleksa (IKK) (May i Ghosh, 1999). Ovom fosforilacijom se IκB obeležava za ubikvitinaciju i naknadnu proteazomsku degradaciju, čime se oslobađa aktivni NFκB dimer. NFκB se zatim transportuje u jedro i vezuje za κB promotore ciljnih gena (slika 13).



Slika 13: Mehanizam aktivacije NFκB kompleksa.

NFκB familija transkripcionih faktora reguliše veliki broj gena, kao što su faktori rasta, citokini, hemokini, adhezioni molekuli i mnogi drugi faktori plastičnosti (Pahl, 1999). Odavno je poznato da NFκB ima ulogu ključnog regulatora apoptoze jer

indukuje gene preživljavanja u koje spadaju cIAP, Bcl-2, superoksid dismutaza (SOD). Sa druge strane, NFκB može da moduliše i ekspresiju citokina koji promovišu apoptozu, kao što su TNF-α i FasL. Na primer, pokazano je da aktivacija NFκB u glijalnim ćelijama (mikrogliji i astrocitima) može indirektno da promoviše smrt neurona. Mikroglija i astrociti na taj način sintetišu velike količine proinflammatoryh citokina, reaktivnih kiseoničnih vrsta i ekscitotoksina (John i saradnici, 2003).

### 1.5. Sinaptička plastičnost

Termin *plastičnost* mozga se odnosi na sposobnost mozga da se strukturno i funkcionalno menja u odgovoru na različite stimulse. Sinaptička plastičnost je prvobitno predložena kao osnovni mehanizam učenja i pamćenja (Hebb, 1949). Pravilo plastičnosti koje je predložio Hebb se zasniva na postulatu da kada jedan neuron upravlja aktivnošću drugog neurona, za veze između njih se kaže da su potencirane („neurons that fire together, wire together“).

Jedna od osnovnih podela sinaptičke plastičnosti je na funkcionalnu i strukturnu. Za razliku od bilo koje forme funkcionalne plastičnosti koja menja sinaptičku jačinu bez promene anatomskih veza među neuronima, strukturna plastičnost podrazumeva promene u broju sinapsi, gustini aksonskih vlakana, obrascima aksonskog i dendritskog grananja, šemama sinaptičke povezanosti, a čak i ukupnom broju neurona. Promene u šemama sinaptičkih veza se zasnivaju na gubitku (Bastrikova i saradnici, 2008) i/ili formiranju novih sinapsi (Knott i saradnici, 2006). Sinaptičko rearanžiranje se može desiti i usled povlačenja i ponovnog formiranja dendritskih trnova (Trachtenberg i saradnici, 2002).

Strukturna plastičnost se dalje može podeliti na reaktivnu i spontanu. **Reaktivna strukturna plastičnost** se javlja nakon farmakološke ili hirurške intervencije u perifernom ili centralnom nervnom sistemu, dok se spontana ili iskustveno-zavisna strukturna plastičnost javlja normalno tokom razvića ili u adultnom mozgu (Butz i saradnici, 2009). Strukturna plastičnost tokom ontogenije se karakteriše značajnim prekobrajnim sinapsama čiji se broj naknadno smanjuje do adultnih nivoa (Changeux i Danchin, 1976).

### 1.5.1. MAP-2

Glavna odrednica morfologije neurona je citoskelet koga čine mikrofilamenti, intermedijerni filamenti i mikrotubule. Različiti proteini, nazvani proteini vezani za mikrotubule (*engl.* microtubule-associated proteins, MAP) vezuju se za polimere tubulina i regulišu njihovu funkciju (Wiche i saradnici, 1991). MAP-2 predstavlja grupu termo-stabilnih proteina koji su veoma zastupljeni u CNS-u (Wiche, 1989). MAP-2 imaju važnu ulogu u izrastanju neurita i plastičnosti neurona (Johnson i Jope, 1992). Ovi proteini takođe utiču na dinamiku citoskeleta, kao i na transport organela u aksonima i dendritima.

Postoji nekoliko MAP-2 izoformi podeljenih u dve grupe: prvu grupu čine proteini sa visokom molekulskom težinom (MAP-2A i MAP-2B), dok u drugu grupu spadaju proteini sa niskom molekulskom težinom (MAP-2C i MAP-2D) (Sanchez i saradnici, 2000). Tokom razvića nervnog sistema, izoforme MAP-2 proteina su različito zastupljene. MAP-2B je prisutan tokom celog razvića nervnog sistema, dok je MAP-2A najzastupljeniji u adultnom mozgu, ali je detektovan i u humanom fetalnoj kičmenoj moždini (Binder i saradnici, 1984). MAP-2C protein, kao i njegova iRNK, su eksprimirani u ranim fazama razvića (Couchie i Nunez, 1985). Za razliku od toga, MAP-2D protein je detektovan samo u preseccima mozgova pacova starih 5 dana, iako je njegova iRNK prisutna tokom svih razvojnih faza (Ferhat i saradnici, 1994). Različita ekspresija MAP-2 izoformi i njihovih iRNK tokom razvića nervnog sistema ukazuje na kompleksnu regulaciju njihove ekspresije kako na transkripcionom, tako i na translacionom nivou.

### 1.5.2. Drebrin

Drebrin (*engl.* developmentally regulated brain protein) je kloniran pre više od dvadeset godina i otkriven je kao protein koji interaguje sa aktinom (Shirao i saradnici, 1988).

Drebrin je veoma zastupljen u kori, hipokampusu, bademastom jedru, talamusu i strijatumu (Hayashi i saradnici, 1996). Kod sisara drebrini su zastupljeni u dve forme koje nastaju alternativnom obradom istog gena. Drebrin A (125 kDa) se ekspimiru u

adultnim tkivima, dok drebrin E (115 kDa) predstavlja embrionalnu formu. iRNK za drebrin A sadrži internu sekvencu od 138 nukleotida koja nije zastupljena kod drebrina E (Jin i saradnici, 2002).

Tokom razvika mozga šema ekspresije ovih izoformi je prostorno i vremenski regulisana. Drebrin se specifično akumulira u dendritskim trnovima gde reguliše njihov oblik i gustinu putem rearanžiranja citoskeletnih aktinskih filamenata (Hayashi i saradnici, 1996). Sposobnost drebrina da brzo oblikuje ćelijske membrane daje objašnjenje zašto je drebrin uključen u promene morfologije i gustinu dendritskih trnova koje su zavisne od aktivnosti (Mizui i saradnici, 2005).

Pacovi kod kojih je pomoću antisens oligonukleotida isključen drebrin A u čitavom mozgu (*knockdown*) pokazuju deficite u formiranju memorije i kognitivnim funkcijama (Kobayashi i saradnici, 2004). Ovi podaci su u korelaciji sa smanjenjem drebrina A u mozgu pacijenata obolelih od Alchajmerove bolesti, kao i kod pacijenata sa Daunovim sindromom (Shim i Lubec, 2002), što može da ukaže na neophodnost drebrina u višim moždanim funkcijama, kao što su pamćenje, učenje i kognicija.

### 1.5.3. GAP-43

GAP-43 (*engl.* growth-associated protein-43) je prvobitno povezan sa rastom neurona (Skene i Willard, 1981). Njegov značaj je istaknut kada je pokazano da delecija GAP-43 gena kod miševa dovodi do smrti ubrzo nakon rođenja (Strittmatter i saradnici, 1995). U drugoj studiji je pokazano da kod neurona čiji konusi rasta ne sadrže GAP-43, dolazi do smanjenja u prostiranju, grananju i adheziji neurita (Aigner i Caroni, 1995).

Pacovski GAP-43 sadrži 226 aminokiselina, međutim njegova faktička molekulska (25 kDa) težina daleko je manja od molekulske težine dobijene razdvajanjem na SDS-poliakrilamidnom gelu (43 kDa) (Basi i saradnici, 1987). Ovaj efekat nastaje usled velikog naelektrisanja GAP-43 zbog čega se manje SDS-a vezuje za aminokiseline, a drugi razlog je što GAP-43 ima izduženu proteinsku strukturu (Benowitz i Routtenberg, 1997).

Nivo GAP-43 opada u većini neurona u kojima su sinapse formirane, međutim visoki nivo ovog proteina se i dalje može detektovati u sinapsama limbičkog sistema i asocijativnim regionima neokorteksa, dok se niski nivo detektuje u primarnim

senzornim i motornim regionima (Benowitz i Routtenberg, 1997). Ovaj obrazac ekspresije ukazuje da GAP-43 omogućava promene vezane za skladištenje informacija (Benowitz i Routtenberg, 1997). U adultnom mozgu pacova, GAP-43 iRNK je detektovana u CA3 regionu hipokampusa, granularnom sloju malog mozga, različitim parasimpatičkim preganglijskim neuronima, pojedinim talamičkim jedrima, neokorteksu i hipotalamusu (Kruger i saradnici, 1993). Ovi neuroni imaju dugačke aksone i izraženo grananje aksonskih završetaka (Kruger i saradnici, 1993).

GAP-43, prisutan na ćelijskoj membrani konusa rasta aksona, interaguje sa heterotrimernim G proteinima i aktivira transdukciju preko receptora vezanih za G proteine (Strittmatter i saradnici, 1993). U mozgu je GAP-43 jedan od glavnih supstrata protein kinaze C (Caroni, 2001). Kada PKC fosforiliše GAP-43 na poziciji Ser41, on se direktno vezuje za aktinske filamente (He i saradnici, 1997). GAP-43 se može vezati za aktinske filamente i u nefosforilisanom stanju, ali sa znatno nižim afinitetom (He i saradnici, 1997). Postoji značajna razlika u aktivnosti fosforilisanog i nefosforilisanog GAP-43 proteina; fosforilisana forma intenzivno stimuliše izduživanje filopodija, za koje se smatra da predstavljaju prvi korak u procesu grananja neurita, dok nefosforilisana forma deluje kao kapa koja zadržava izduživanje filopodija u konusu rasta (He i saradnici, 1997). Pored osnovne uloge grananja neurita tokom razvika i regeneracije, GAP-43 ima ulogu u oslobađanja neurotransmitera, endocitozi, recikliranju sinaptičkih vezikula, dugotrajnoj potencijaciji, kao i formiranju prostornog pamćenja i učenja.

#### **1.5.4. Sinaptofizin**

Sinaptofizin je glavni integralni membranski protein sinaptičkih vezikula i prvi identifikovani protein nervnih završetaka (Jahn i saradnici, 1985). S obzirom na to da je sinaptofizin isključivo lokalizovan u sinaptičkim vezikulama, koristi se kao marker presinaptičke oblasti. Pored sinaptofizina I, sinaptičke vezikule sadrže i njegov homolog- membranski protein sinaptoporin ili sinaptofizin II (Knaus i saradnici, 1990). Sinaptofizin I i II su različito rasprostranjeni u mozgu. Sinaptofizin I je široko eksprimiran u praktično svim sinapsama, dok je sinaptofizin II eksprimiran u visokim

nivoima samo u određenoj populaciji neurona, što ukazuje da sinaptofizin II ima specijalizovane uloge (Fykse i saradnici, 1993).

U nervnim završecima, tirozin-kinaze fosforilišu sinaptofizin, što ukazuje da je ovaj proces centralan za njegovu funkciju. Bez obzira na to što je sinaptofizin najzastupljeniji protein sinaptičkih vezikula (predstavlja oko 10% ukupnih proteina sinaptičkih vezikula) (Takamori i saradnici, 2006), sinaptofizin *knockout* miševi su vijabilni i bez vidljivih poremećaja u oslobađanju neurotransmitera (Eshkind i Leube, 1995). Smatra se da u tom slučaju uloge sinaptofizina preuzimaju druge izoforme kao što su sinaptofizin II i/ili sinaptogirin. U skladu sa tim je pokazano da miševi koji nemaju ni sinaptofizin, ni sinaptogirin pokazuju defekte u sinaptičkoj plastičnosti, međutim indukovano oslobađanje neurotransmitera kod ovih životinja je i dalje bilo normalno (Janz i saradnici, 1999), što je navelo istraživače na nove uloge koje bi sinaptofizin mogao da ima u tačno određenim fazama ciklusa sinaptičkih vezikula.

#### **1.5.5. Sinuklein-1**

Sinuklein čini familiju od tri mala, solubilna proteina ( $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -sinuklein) kodirana sa tri različita gena i do sada detektovan samo kod kičmenjaka. Proteini  $\alpha$ - i  $\beta$ -sinuklein se predominantno nalaze u kori, hipokampusu, strijatumu, talamusu i malom mozgu (Iwai i saradnici, 1995). Iako su detektovani u presinaptičkim završecima, do danas nisu otkriveni postsinaptički ciljevi njihovog delovanja. Zbog toga se pretpostavlja da je njihova uloga u formiranju ili metabolizmu presinaptičkih vezikula. Protein  $\gamma$ -sinuklein je primarno otkriven u perifernom nervnom sistemu i mrežnjači, međutim njegova ekspresija se koristi kao marker progresije tumora dojke.

Iako su fiziološke uloge sinukleina još uvek nepoznate, nekoliko podataka ukazuje na njegovu ulogu u procesima vezanim za membranu presinaptičkih završetaka:  $\alpha$ -sinuklein se povišeno eksprimira u specifičnoj populaciji presinaptičkih završetaka u mozgu ptica pevačica tokom perioda sinaptičkih rearanžiranja tokom učenja novih pesama (George i saradnici, 1995). Pokazano je da  $\alpha$ -sinuklein *knockout* miševi imaju pojačano oslobađanje dopamina na nigrostrijatalnim završecima u odgovoru na električni stimulus, što ukazuje da je ovaj protein negativni regulator dopaminske transmisije koja je zavisna od aktivnosti (Abeliovich i saradnici, 2000). Potpuno



uklanjanje  $\alpha$ -sinukleina iz kulture primarnih neurona hipokampusa pomoću antisens oligonukleotida dovodi do opadanja distalnog rezervoara presinaptičkih vezikula (Murphy i saradnici, 2000). Tokom postnatalnog razvića glodara detektovan je porast ekspresije iRNK i proteina za  $\alpha$ -sinuklein, koji zatim opada sa starenjem (Hsu i saradnici, 1998).

Mutacije u  $\alpha$ -sinukleinu su povezane se retkom familijarnom ranom pojavom Parkinsonove bolesti, a veoma visoka ekspresija ovog proteina je detektovana u Parkinsonovoj, Alchajmerovoj bolesti i u drugim neurodegenerativnim oboljenjima koje se zajedno zovu sinukleopatije (Di Rosa i saradnici, 2003).

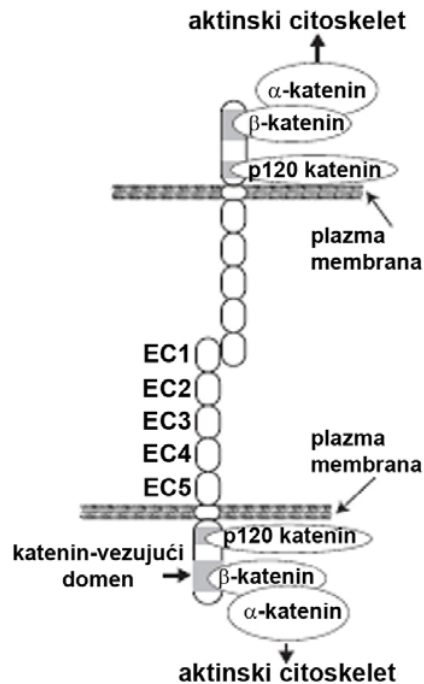
### 1.5.6. N-kadherin

Sinapse u CNS-u su visoko specijalizovani regioni kontakta dve ćelije čija je funkcija da brzo i efikasno prenesu signal iz jedne u drugu ćeliju. Da bi formirala sinapsu ćelija mora prvo da prepozna odgovarajući cilj i da regrutuje pre- i postsinaptičke elemente na tačno određene mikrodomene na mestima kontakta dve ćelije (Ziv i Garner, 2004). Zbog toga se transmembranski adhezioni proteini smatraju jednim od učesnika u formiranju novih sinapsi. Klasa transmembranskih adhezionih proteina obuhvata kadherine, integrine, efrinske receptore, neureksin-neuroigine, kao i članove imunoglobulinske superfamilije kao što su N-CAM i nektin (Scheiffele, 2003).

Kadherini predstavljaju familiju kalcijum-zavisnih adhezionih molekula (Yoshida i Takeichi, 1982). Kadherini su transmembranski proteini sa tandemskim ponovcima EC domena (*engl.* extracellular cadherin), dok se u citoplazmi nalazi domen uz samu membranu i katenin-vezujući domen (slika 14). Domen uz membranu sadrži sekvencu za koju se vezuje p120 familija katenina. Ovi proteini regulišu površinsku stabilnost kadherina (Chen i saradnici, 2003). Za katenin-vezujući domen se vezuju  $\beta$ -katenini, a za njih se vezuju  $\alpha$ -katenini i pomoću ovog kompleksa kadherini su usidreni u aktinski citoskelet, što je presudno važno za povezivanje susednih ćelija (slika 14) (Kintner, 1992).

Kadherini se dele u dve grupe na osnovu njihovog EC regiona: tip I/II se nalazi samo kod kičmenjaka i sadrži pet EC domena, dok se tip III nalazi kod beskičmenjaka,

riba i ptica, ali ne i sisara i broj njihovih EC domena varira (Tanabe i saradnici, 2004). N-kadherin pripada tipu I zajedno sa E-, P- i R-kadherinima.



Slika 14: Povezivanje N-kadherinskih molekula u međucelijskom prostoru i njihovo vezivanje za unutarćelijske katenine.

N-kadherin ima važne uloge u održavanju integriteta neuroepitelnih ćelija tokom embrionalnog razvika mozga (Hatta i saradnici, 1987). Ranije *in vitro* studije su pokazale da N-kadherin podstiče izduživanje neurita neurona gajenih na ne-neuronalnim ćelijama koje eksprimiraju N-kadherin (Matsunaga i saradnici, 1988).

Kadherini se nalaze i na pre- i postsinaptičkim mestima mnogih neurona CNS-a (Salinas i Price, 2005). Ekspresija i subćelijska lokalizacija kadherina zavisi od tipa i razvojnog stadijuma sinapse. Lokalizacija ovih molekula na mestu kontakta filopofija-akson ukazuje da oni utiču na stabilizaciju kontakta, koja može da pokrene sazrevanje dendritskih trnova i sinaptičku diferencijaciju. Inhibicija kadherinskih kontakata sprečava sazrevanje trnova i dendritski nastavci onda zadržavaju dugačku i nezrelu filopodijalnu morfologiju (Salinas i Price, 2005). Tako da je zaključeno da je kontaktna stabilizacija, posredovana formiranjem kadherin-katenin-aktin kompleksa, esencijalna za odgovarajuće sazrevanje dendritskih trnova. Međucelijske kadherinske interakcije su bitne i za uobličavanje postsinaptičkog odeljka. Kadherinski kontakti su važni i za

odgovarajuću lokalizaciju PSD-95 (*engl.* postsynaptic density marker) (Honjo i saradnici, 2000). Pored uloge koju imaju u regulaciji aktinskog citoskeleta, kadherinski kompleksi deluju kao signalni čvorovi koji vezujući tirozin kinaze i fosfataze, aktiviraju PI3-kinaze i interaguju sa adapterskim proteinima.

## 2. CILJEVI RADA

Utvrđeno je da primena opštih anestetika, uključujući i propofol, tokom ranog postnatalnog perioda može da utiče na morfologiju i plastičnost neurona, dok stepen preživljavanja ne mora značajno da se promeni. S obzirom na to da se propofol koristi u kliničkoj praksi, njegovi molekularni mehanizmi su nedovoljno ispitani. Načelni cilj ove doktorske disertacije je bio da se detaljno ispituju promene koje anestetska doza propofola (25 mg/kg) izaziva u kori i talamusu 14 dana starih *Wistar* pacova kako u pogledu ekspresije neurotrofina i odgovarajućih signalnih puteva, tako i u ekspresiji pokazatelja apoptotskih promena i sinaptičke plastičnosti. U skladu sa tim definisani su sledeći neposredni zadaci istraživanja:

1. Ispitati uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju ukupne iRNK za BDNF, kao i na ekspresiju proteina proBDNF i zrele forme BDNF.
2. Ispitati uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju ukupne iRNK za NGF, kao i na ekspresiju proteina proNGF i zrele forme NGF.
3. Ispitati uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju ukupnih i fosforilisanih formi receptora za neurotrofine (TrkA i TrkB).
4. Ispitati uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju p75 receptora.
5. Ispitati da li propofolski tretman izaziva promene u ekspresiju ukupnog i fosforilisanog proteina Akt.
6. Ispitati da li propofolski tretman izaziva promene u ekspresiju ukupnog i fosforilisanog proteina ERK1/2.
7. Ispitati da li propofolski tretman izaziva promene u aktivnosti markera inflamacije i apoptoze, tj. da li izaziva promene u ekspresiji: iRNK za TNF- $\alpha$ , iRNK za TNFR1, aktivnog fragmenta kaspaze-3, XIAP proteina i NF $\kappa$ B p65 proteina.
8. Ispitati apoptotski potencijal propofolske anestezije u kori i talamusu PND14 pacova na histološkom nivou, tj. da li tretman izaziva promene u broju Fluoro-žad B pozitivnih ćelija.
9. Ispitati da li propofolski tretman izaziva promene u aktivnosti markera sinaptičke plastičnosti u kori i talamusu PND14 pacova, tj. da li izaziva promene u ekspresiji proteina: MAP-2, drebrina, GAP-43, sinaptofizina, sinukleina-1 i N-kadherina.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Etička izjava**

Svi eksperimenti su odobreni od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković” (pod brojem 28/09) i Etičkog komiteta Univerziteta u Virdžiniji.

#### **3.2. Eksperimentalne životinje i tretman**

U eksperimentima su korišćeni četrnaest dana (PND14) stari mužjaci pacova soja *Wistar*, sa prosečnom telesnom težinom oko 41 g, odgojeni u vivarijumu Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković”. Životinje su gajene u matičnim okotima (2 okota po kavezu) i 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 i hrani). Uz PND14 pacove koristili smo i po 5 životinja starosti 7, 18, 21 i 35 dana (PND7, PND21, PND28 i PND35, redom). Detaljan opis dat je u delu *Starosno-zavisni efekat odabrane doze propofola*.

Životinje su intraperitonealno tretirane propofolom koji je proizveden za humanu upotrebu (Recofol<sup>®</sup>, Schering, Turku, Finska). Pored aktivne supstance, formulacija sadrži ulje soje, prečišćene fosfatide jaja, glicerol i natrijum hidroksid. Ampule su korišćene prema instrukcijama proizvođača.

#### **3.3. Odabir doze propofola i procena stanja anestezije**

Nezavisan eksperiment je urađen u cilju određivanja optimalne doze propofola koja je sposobna da indukuje efektivnu anesteziju i koja će biti korišćena u daljim istraživanjima. Pacovi stari 14 dana su intraperitonealno injecirani propofolom u dozi 10, 25, 50, 75 ili 100 mg/kg. Odsustvo refleksa ispravljanja (*engl. righting reflex*) je služio kao indikator anestetskog delovanja propofola, a trajanje perioda u kome je ovaj refleks posmatran je mereno štopericom. Takođe je praćen vremenski period nakon tretmana koji je neophodan da bi se ovaj refleks ispoljio. Test štipanja repa (*engl. tail*

*pinch test*) je primenjivan da bi se ispitale bolne senzacije kod anesteziranih životinja. Takođe su posmatrane promene u boji kože. Dobijene vrednosti su prikazane u delu *Rezultati* (slika 15).

Propofol je u izabranoj dozi od 25 mg/kg izazvao gubitak refleksa ispravljanja, a ovaj period u kome su životinje ostajale nepomične je iznosio  $20 \pm 2$  min. Odsustvo reakcije na bolni nadražaj je primećeno i iznosilo je oko 14 minuta.

### **3.4. Starosno-zavisni efekat odabrane doze propofola**

Da bismo procenili uticaj starosti eksperimentalnih životinja na anestetske sposobnosti izabrane doze propofola (25 mg/kg) u eksperiment su uključene i životinje starosti: PND7, PND21, PND28 i PND35. Dobijeni rezultati su prikazani u delu *Rezultati* (slika 16).

### **3.5. Eksperimentalna procedura**

Neposredno pre izvođenja eksperimenta životinje ( $n=55$ ) su odvajene od majki i stavljane u kutiju od pleksiglasa u kojoj se temperatura održava na  $35^{\circ}\text{C}$ . Oformljeno je sedam eksperimentalnih grupa ( $n=4$  životinje po grupi), shodno vremenu nakon tretmana kada je obavljano žrtvovanje (0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 sata nakon tretmana). Životinje koje nisu žrtvovane odmah nakon tretmana su ostavljane da se oporave 1 sat i zatim su vraćene svojim majkama radi adekvatne ishrane do predviđenog vremena žrtvovanja. Nakon žrtvovanja životinja izolovani su i zamrznuti kora i talamus iz obe hemisfere za PCR i Western blot metode. S obzirom da je mala količina tkiva izolovana po životinji, uzorci su pulovani ( $n=4$ ).

Za Fluoro-Žad bojenje korišćeno je 12 pacova, podeljenih u 4 grupe ( $n=3$  životinje po grupi). Prva grupa je injecirana fiziološkim rastvorom (kontrola), dok su tri grupe injecirane propofolom (25 mg/kg) i žrtvovane 8, 16 i 24 sata nakon tretmana. Iz ovih životinja su izolovani celi mozgovi. U cilju određivanja doze propofola koja kod PND14 pacova indukuje neurodegeneraciju, urađen je nezavisan Fluoro-žad B eksperiment na 15 pacova podeljenih u 5 grupa ( $n=3$  životinje po grupi): kontrolna i

tretirana propofolom u dozama 25, 50, 75 i 100 mg/kg. Životinje su žrtvovane 16 sati nakon tretmana. Iz ovih životinja su izolovani celi mozgovi.

Ventilacija, oksigenacija i perfuzija PND14 pacova nije bila moguća usled tehničkih poteškoća. Međutim, životinje su pažljivo praćene kako za vreme tako i u prvim satima nakon tretmana, tj. i nakon vraćanja u matično leglo. Sve su imale roze boju kože i bile bez vidljivih tragova cijanoze. U ovim eksperimentima nije ispitan uticaj rastvarača (lipidne emulzije) s obzirom da je cilj ovog istraživanja da se ispituju efekti propofola u formulaciji u kojoj se on koristi u humanoj populaciji. Treba spomenuti da je u nekoliko istraživanja pokazano da lipidna emulzija nema značajnih štetnih efekata, ali može da bude značajna u pogledu anestetskih svojstava samog propofola (Nakao i saradnici, 2003; Vutskits i saradnici, 2005; Bjornstrom i saradnici, 2008; Turina i saradnici, 2008).

### **3.6. Izolacija tkiva**

Životinje su žrtvovane u različitim vremenskim tačkama (0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 sata nakon tretmana). Kora i talamus obe hemisfere su izolovani na hladnoj površini, kako bi se ublažilo dejstvo proteolitičkih enzima. Proteini i RNK su izolovani iz posebnih homogenata (n=4 uzorka po homogenatu). Uzorci su do trenutka izolacije čuvani na -80°C.

### **3.7. Izolacija RNK i PCR analiza**

#### **3.7.1. Izolacija RNK**

Ukupna RNK je izolovana iz tkiva (kora, talamus) korišćenjem TRIZOL reagensa, prema instrukcijama proizvođača (Invitrogen). Postupak izolacije se sastoji iz nekoliko koraka:

- **homogenizacija**– tkivo je homogenizovano u odnosu 1 ml reagens na 0,1 g tkiva u tubama korišćenjem plastičnih tučkova za homogenizaciju tkiva;
- **razdvajanje faza**– homogenizovani uzorci se inkubiraju 5 minuta na sobnoj temperaturi da bi nukleoproteinski kompleksi u potpunosti disosovali i zatim je dodat

hloroform (0,2 ml na 1 ml TRIZOL-a). Tube se intenzivno protresu (dok se ne dobije mlečno-roze boja) i dodatno inkubiraju na sobnoj temperaturi 2-3 minuta. Zatim se pristupa centrifugiranju uzoraka (15 minuta na 12000 x g na 4°C) radi razdvajanja sadržaja na fenol-hloroformsku fazu (donja faza), interfazu i gornju bezbojnu vodenu fazu u kojoj se nalazi RNK. Zapremina vodene faze teoretski iznosi oko 60% ukupnog volumena TRIZOL-a korišćenog za homogenizaciju.

- **precipitacija RNK**– vodena faza se prenosi u nove tubice i u iste dodaje izopropanol (0,5 ml na 1 ml TRIZOL-a). Tube se protresu a zatim inkubiraju 10 minuta na sobnoj temperaturi. Očekuje se blago zamućenje. Nakon toga sledi centrifugiranje (10 minuta na 12000 x g na 4°C) sa ciljem precipitacije RNK u vidu beličastog taloga na dnu tubica;

- **ispiranje RNK**– nakon uklanjanja supernatanta u talog RNK se dodaje 1 ml rastvora 75% etanola u 0,1% DEPC-tretiranoj vodi (dejonizovana voda tretirana 0,1 %-tnim dietilpirokarbonatom, potentnim inhibitorom RNK-aze, autoklavirana i ohlađena). Tube se lagano vorteksuju da se talog odvoji od dna. Nakon toga se uzorci centrifugiraju (5 minuta na 7500 x g na 4°C);

- **rastvaranje RNK**– nakon centrifugiranja se odlije supernatant. Tubice se polože radi sušenja materijala (oko 10 minuta na sobnoj temperaturi), nakon čega se pristupa rastvaranju RNK u 50 µl 0,1% DEPC-tretirane vode blagim vorteksovanjem. Uzorci se mogu inkubirati kratko (5-7 minuta) na 60°C, u cilju potpunog rastvaranja RNK. Rastvoreni uzorci se čuvaju na -80°C.

### 3.7.2. Određivanje koncentracije i provera kvaliteta RNK

Koncentracija RNK je određena spektrofotometrijski, u razblaženjima uzoraka (1 µl uzorka + 49 µl dejonizovane vode i 2 µl uzorka + 48 µl dejonizovane vode), merenjem apsorbance (A) na 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf). Iz odnosa  $A_{260}/A_{280}$  procenjena je čistoća uzoraka, tj. kontaminacija proteinima.

Kvalitet izolovane RNK je proveren elektroforezom uzoraka na 1% agaroznom gelu (1 g agaroze u 100 ml 1xTBE pufera (0,09 M Tris-borat, 0,02 M EDTA, pH 8,2)). Uzorci za nalivanje na gel se pripremaju tako što se 1 µl uzorka sa RNK pomeša sa 3 µl boje (0,4% bromfenol plavo u 50% glicerolu). Pripremljeni uzorci se nanose na



polimerizovan agarozni gel uronjen u adekvatni tank sa 1xTBE puferom na 70-100V. Nakon elektroforeze RNK se vizuelizuje na Gel Doc sistemu (Gel Doc 1000, Bio Rad). Intaktnost i kvalitet izolovane RNK se određuje na osnovu izgleda traka za 28S i 18S rRNK, kao i odnosa njihovog intenziteta koji bi trebalo da iznosi 1,6–2,0.

### 3.7.3. DNA-zni tretman

Pre ulaska u reakciju reverzne transkripcije (*engl.* reverse transcription– RT) izolovana totalna RNK je podvrgnuta tretmanu deoksiribonukleazom I (DNA-zom I), kako bi se eliminisala eventualno zaostala genomska DNK koja pri PCR reakciji može dati lažan rezultat u pogledu genske ekspresije. Tretman DNA-zom I je izveden po protokolu proizvođača reakcionih komponenti (Fermentas, Litvanija). Na 1 µg uzorka RNK se dodaje 1 µl DNA-ze I (1U/ µl), 1 µl 10 x reakcionog pufera sa magnezijum hloridom i do zapremine od 9 µl dopuni DEPC-tretiranom vodom. Reakciona smeša se zatim inkubira 30 minuta na 37°C. Nakon toga se doda 1 µl 25 mM EDTA (tako da je finalna zapremina smeše koja sadrži 1µg uzorka 10 µl) i inkubira dodatno 10 minuta na 65 °C (ovaj korak služi da se inaktivira DNA-za I). U našim eksperimentima je rađeno sa 5 µg uzorka. Neophodne količine pomenutih reagenasa su dobijene adekvatnim povećanjem zapremine, tako da je finalna zapremina smeše sa uzorkom iznosila 50 µl. Nakon inkubacije sa EDTA uzorci se hlade na ledu i pristupa se izvođenju RT reakcije.

### 3.7.4. Reakcija reverzne transkripcije i semikvantitativni PCR

RT reakcija služi da se na osnovu RNK molekula kao matrice sintetiše komplementarni (*engl.* complementary) lanac molekula DNK (cDNK). U reakcionu smešu dobijenu u procesu DNA-znog tretmana se dodaje 51 µl RT smeše, koja se sastoji od sledećih komponenti u finalnoj koncentraciji: 0,65 µM oligo-dT<sub>16</sub>, 1x pufer, 50 µM dATP, 50 µM dTTP, 50 µM dGTP, 50 µM dCTP, 10 mM DTT, 0,4 U/µl ribonukleaznog inhibitora (RNAzin) i 5 U/µl M-MLV reverzne transkriptaze. Nakon sjedinjavanja ove dve smeše uzorci se kratko vorteksuje i centrifugiraju, a zatim inkubiraju 60 minuta na 42°C. Dodatnim inkubiranjem 10 minuta na 95 °C RT reakcija

se prekida. Uzorci (u kojima je koncentracija cDNK 50 ng/μl) se potom ostave nekoliko minuta na ledu i do daljeg korišćenja čuvaju na -20°C.

Lančana reakcija polimeraze se označava kao PCR (*engl.* polymerase chain reaction). Zasniva se na seriji lančanih reakcija čime se amplifikuje ciljna sekvenca na DNK. Za ovu reakciju je potrebna DNK matrica (cDNK), amplimeri (kratki oligonukleotidi komplementarni matrici), dezoksiribonukleotidi, pufer i enzim DNK zavisna DNK polimeraza (Taq polimeraza) koji katalizuje ugradnju nukleotida u novi lanac DNK. Proces amplifikacije se izvodi u seriji cikličnih izmena temperatura čime se obezbeđuje denaturacija molekula DNK, hibridizacija amplimera sa matricom i njegova elongacija. Za uspešnu amplifikaciju svake target sekvence moraju se optimizovati uslovi, kao što su temperatura hibridizacije amplimera (*engl.* annealing), koncentracija magnezijumovih (Mg<sup>2+</sup>) jona, koncentracija amplimera, koncentracija cDNK i ukupni broj ciklusa amplifikacija.

Semikvantitativnom RT-PCR analizom se istovremeno određuje nivo ekspresije gena od interesa i kontrolnog gena (koji se paralelno amplifikuje u istoj smeši), što je rađeno u našim eksperimentima. Kontrolni gen se još naziva endogena ili interna kontrola i predstavlja konstitutivno eksprimirani gen koji ima konstantnu ekspresiju nezavisno od tkiva, sredinskih faktora i stanja u kome se ćelija nalazi. Određivanjem nivoa ekspresije gena od interesa u odnosu na nivo ekspresije kontrolnog gena se neutrališe eksperimentalna greška. Kao kontrole su korišćeni gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (*gapdh*) i *β-aktin*.

RT-PCR reakcije u ovom eksperimentu su rađene sa prajmerima specifičnim za sledeće transkripte (u zagradama su reference iz kojih su sekvence preuzete): ukupnu iRNK za TNF-α i TNFR1 (Yakovlev i Faden, 1994). Kao kontrole za TNF-α korišćeni su prajmeri specifični za gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) (Wong i saradnici, 1994), a za TNFR1 je korišćen β-aktin (NicAmhlaoihb i saradnici, 1999). Različite endogene kontrole se koriste kako bi se izbeglo preklapanje signala kontrolnih i ciljnih gena usled približno istih dužina fragmenata.

Reakcije su izvođene na GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Sekvence prajmera i uslovi u kojima su PCR reakcije rađene su prikazani u tabeli 1. Odnosi prajmera bili su sledeći (u zagradama su date finalne koncentracije):

GAPDH : TNF $\alpha$  = 1 : 3 (0,07  $\mu$ M : 0,21  $\mu$ M);  $\beta$ -aktin : TNFR1= 1 : 2,8 (0,07  $\mu$ M : 0,2  $\mu$ M).

U svakoj reakciji je korišćeno 200 ng cDNK. U svim reakcijama koncentracija MgCl<sub>2</sub> 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. Inicijalna denaturacija je trajala 5 minuta na 95°C, nakon čega sledi određeni broj ciklusa optimizovan za svaki par analiziranih prajmera (naznačen u tabeli 1) koji podrazumeva: denaturaciju (u trajanju od 15 sekundi na 94°C), aniling (u trajanju od 30 sekundi na temperaturi specifičnoj za dati par prajmera, prikazana u tabeli 1) i elongaciju (u trajanju od 30 sekundi na 72°C). Nakon toga uzorci se mogu čuvati na 4°C neograničeno dugo.

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>tnfr1</i>	TTGTGCTCGTGGCTCTGCT	298	94°C 15 s	26
	ACCTGGAACATTTCTTTCCGAC		58°C 30 s 72°C 30 s	
<i>tnf-<math>\alpha</math></i>	GCCCTAAGGACACCCCTGAGGGAGC	158	94°C 15 s	28
	TCCAAAGTAGACCTGCCCGACTCC		58°C 30 s 72°C 30 s	
<i>gapdh</i>	CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT	306	u zavisnosti od ciljnog gena	
	AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC			
<i><math>\beta</math>-aktin</i>	TGGACATCCGCAAAGACCTGTAC	142	u zavisnosti od ciljnog gena	
	TCAGGAGGAGCAATGATCTTGA			

### 3.7.5. Analiza i kvantifikacija PCR produkata

PCR produkti su analizirani na 2% agaroznom gelu. Na gelu se analizira ceo reakcioni volumen od 25  $\mu$ l u koji je dodato 5  $\mu$ l boje (0,4 % bromfenol plavo u 50 % -tnom glicerolu). Nakon elektroforeze u 1X TBE puferu produkti se vizuelizuju na Gel Doc sistemu (Gel Doc 1000, Bio Rad) i pristupa se denzitometrijskoj analizi i kvantifikaciji dobijenog signala na Multi-Analyst/PC Software Image Analysis System (Gel Doc 1000, 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.

### 3.7.6. Reakcija reverzne transkripcije i RT-PCR u realnom vremenu

Za analizu promena na nivou iRNK je korišćena i metoda RT-PCR-a u realnom vremenu (*engl.*, relative quantification polymerase chain reaction– RQ-PCR). Ova metoda je u odnosu na semikvantitativni PCR senzitivnija i omogućava detekciju malih promena u količini iRNK.

Sinteza cDNK je urađena u reakciji reverzne transkripcije (nakon DNA-znog tretmana uzoraka RNK) korišćenjem High-Capacity cDNA Archive Kit-a sa nasumičnim heksamerima, prema instrukcijama proizvođača (Applied Biosystems). Reakciona smeša u zapremini od 50 $\mu$ l je sadržavala: 1x RT pufer, 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM svakog nukleotida, 2,5  $\mu$ M amplimera (nasumični heksamer), 0,4 U/ $\mu$ l RNaznog inhibitora, 1,25 U/ $\mu$ l MultiScribe reverzne transkriptaze i 100 ng RNK. Reakcioni profil je bio 10 minuta na 25 $^{\circ}$ C, 30 min na 48 $^{\circ}$ C i 5 minuta na 95 $^{\circ}$ C. Svaki RT eksperiment je bio praćen reakcijom bez reverzne transkriptaze, umesto koje je bila dodavana DEPC voda, da bi se proverila eventualna kontaminacija.

Da bi se metodom RQ-PCR-a dobili pouzdani rezultati neophodno je prvo uraditi eksperimente validacije sa ciljem da se odredi adekvatna endogena kontrola za svaki ispitivani gen u okviru ispitivane grupe uzoraka. Prvo je ispitana efikasnot amplifikacije, tj. kompatibilnost eseja za endogenu kontrolu (*gapdh*) i ciljne gene (*bdnf*, *ngf*) korišćenjem komercijalnih eseja (Assay-on-Demand Gene Expression Product, Applied Biosystems). Identifikacioni broj korišćenih eseja je prikazan u Tabeli 2. Za proveru kompatibilnosti između eseja korišćena su serijska razblaženja odabrane cDNK (jedna iz kore i jedna iz talamusa): 0,01, 0,1, 1, 10 i 100 ng RNK prevedene u cDNK. Reakcionu smešu su osim određene količine cDNK sačinjavali i 1xTaqMan Universal Master Mix sa AmpErase UNG, 1x Assay Mix (6-FAM dye-labeled MGB probes). Sve reakcije su izvedene na aparatu ABI Prism 7000 Sequence Detection System, pod sledećim uslovima: 2 minuta na 50 $^{\circ}$ C, 10 minuta na 95 $^{\circ}$ C i 40 ciklusa po 15 sekundi na 95 $^{\circ}$ C i na kraju 1 minut na 60 $^{\circ}$ C. Vrednost eksperimentalnog “*threshold-a*” (nivo fluorescencije statistički značajno veći od šuma) je određivana na osnovu srednje

vrednosti fluorescentnog signala u intervalu od 3. do 15. ciklusa +10 standardnih devijacija. Tačka u kojoj amplifikaciona kriva seče “*threshold*” definiše se kao Ct (*threshold cycle*) vrednost, i predstavlja broj ciklusa kada amplifikacija ulazi u eksponencijalnu fazu i obrnuto je proporcionalan početnom broju kopija sekvence čiju amplifikaciju pratimo. Svaki uzorak je rađen u triplikatu, a srednja vrednost je uzeta za dalja izračunavanja, tj. definisanje  $\Delta Ct$  vrednosti. Na taj način se dobije 5 tačaka od kojih se konstruiše kriva i određuje efikasnost amplifikacije po jednačini krive ( $y=ax+b$ ). Kompatibilnost eseja je zadovoljavajuća ako je nagib krive manji od 0,1 ( $a<0,1$ ).

Zatim se pristupa određivanju nivoa ekspresije endogene kontrole u svakom uzorku analiziranih moždanih regiona (kora, talamus). Reakcionu smešu za amplifikaciju endogenih kontrola su sačinjavali 1xTaqMan Universal Master Mix sa AmpErase UNG, 1x Assay Mix (6-FAM dye-labeled MGB probes) i cDNK (10 ng RNK prevedeno u cDNK). Sve reakcije su izvedene na aparatu ABI Prism 7000 Sequence Detection System, pod sledećim uslovima: 2 minuta na 50°C, 10 minuta na 95 °C i 40 ciklusa po 15 sekundi na 95 °C i na kraju 1 minut na 60 °C. Analiza podataka je rađena direktnim poređenjem dobijenih Ct vrednosti, gde se dozvoljenim odstupanjem u okviru grupe uzoraka smatra raspon od 2 ciklusa (između najmanje i najveće Ct vrednosti).

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

<b>Gen</b>	<b>Identifikacioni broj</b>
<i>bdnf</i>	Rn00560868_m1
<i>ngf-β</i>	Rn01533872_m1
<i>gapdh</i>	Rn99999916_s1

Nakon izbora odgovarajuće endogene kontrole urađene su TaqMan RQ-PCR reakcije, korišćenjem komercijalnih eseja (Assay-on-Demand Gene Expression Product), čiji su identifikacioni brojevi prikazani u Tabeli 2. Svaki esej je sadržao prajmere za amplifikaciju ciljnih gena i TaqMan MGB (*Minor groove binder*) probu obeleženu sa 6-FAM bojom. Reakcije su rađene na isti način kao i reakcije validacije, u

istim reakcionim smešama, na istom aparatu i istim uslovima, uz korišćenje 1ng RNK prevedene u cDNK.

Svaki uzorak je rađen u triplikatu, a srednja vrednost je uzeta za dalja izračunavanja. U svaku analizu je bila uključena endogena kontrola zbog korekcije internih razlika u efikasnosti amplifikacije, a svaki uzorak je normalizovan na nivo ekspresije svoje endogene kontrole. Kvantifikacija je je urađena  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metodom (Livak i Schmittgen, 2001), a dobijeni rezultati testirani na statističku značajnost ( $p < 0,05$ ) koristeći RQ Study Add ON v 1.1 softverski paket. U okviru grupe uzoraka iz svake od ispitivanih moždanih struktura (kora, talamus) kao kalibrator je korišćen uzorak kontrola (0 sati nakon tretmana). Rezultati su izraženi kao stepen promene u odnosu na adekvatnu kontrolnu grupu kojoj je dodeljena vrednost od 100%.

### **3.8. Izolacija proteina i Western blot analiza**

#### **3.8.1. Izolacija proteina**

Tkivo je homogenizovano i 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 komercijalno nabavljenog 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). Nakon toga supernatanti su odliveni i do dalje analize čuvani na -80°C.

#### **3.8.2. Određivanje koncentracije proteina**

Koncentracija ukupnih proteina određena je metodom po Pierce-u pomoću komercijalno nabavljenog kompleta (Micro BCA Protein Assay Kit; Pierce Inc., Rockford, USA), tzv. mikrometodom, po uputstvu proizvođača. 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 (*engl.* sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE). 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 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 µl 10% amonijum persulfata (ICN) i 5 µl TEMED-a (Serva) na 10 ml smese, za oba gela.

Količina proteina koja je nanošena na gel optimizovana je eksperimentalno za svaki protein pomoću krivih sa sukcesivnim razblaženjima proteina, a sa koncentracijama primarnog antitela preporučenim od strane proizvođača. Kao optimalna količina proteina uzeta je ona koja se nalazi u linearnom opsegu krive zavisnosti intenziteta signala i količine nanetih proteina. Za sve ispitivane proteine nanošeno je po 20 µg ukupnih proteina. Kao pufer za nalivanje korišćen je 2 x Laemmli pufer (31,25 mM Tris pH 6,8; 10% glicerol; 1% SDS; 5% 2-merkaptoetanol; 0,025% bromfenol plavo) dodat uzorku u odnosu 1:1 (v/v). Uzorci su pre nalivanja dodatno denaturisani kuvanjem 3 minuta na 95°C. Kao standard za molekularnu težinu korišćen je obojeni "Rainbow" marker širokog opsega (Amersham). Elektroforeza je vršena u puferu za elektroforezu standardnog sastava (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

Prenos (transfer) 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 pažljivo uklonjen sa staklene ploče i prenet u posudu sa puferom za transfer (20% metanol; 192 mM glicin; 25 mM Tris pH 8,3), gde je ostavljen narednih 15 minuta (ekvilibracija gela). Nitrocelulozna membrana (isečena u dimenzijama gela)

je prvo prana u destilovanoj vodi 10 minuta a zatim prebačena u posudu sa puferom za transfer gde je ekvilibrisana narednih 15 minuta. Pomoćne komponente (filter papir, Watman papir, sunđer) su takođe pripremljene potapanjem u pufer za transfer 30 minuta. Nakon slaganja svih komponenti u kasetu za transfer i ulaganja u tank sa puferom, elektrotransfer proteina je vršen tokom 70 minuta, pod konstantnim naponom od 120 V na sobnoj temperaturi. Po završenom transferu membrane su osušene na sobnoj temperaturi bez ikakvog dodatnog ispiranja. Potom su membrane kvašene u destilovanoj vodi 20 minuta i bojene Ponceau S bojom (1% Ponceau S boja; 5% glacijalna sirćetna kiselina; destilovana voda) radi vizuelizacije proteinskih traka. Gelovi su bojani Coomassie Brilliant Blue bojom (0,25% Coomassie Brilliant Blue R250; 10% glacijalna sirćetna kiselina; 45% metanol; destilovana voda), u cilju dobijanja vizuelne potvrde uspešnosti transfera. Membrane su zatim odbojene ispiranjem u destilovanoj vodi, i potom osušene na sobnoj temperaturi. Do daljeg rada su skladištene (u kesicama od filter papira) na 4°C.

### **3.8.5. Imunološka detekcija imobilizovanih proteina (Western blotting)**

Imunološka detekcija imobilizovanih proteina rađena je na nitroceluloznim membranama koje su prethodno pripremljene tako što su 30 minuta kvašene u posudi sa destilovanom vodom, a zatim blokirane u rastvoru obranog mleka (5%) u Tris-boratom puferu sa dodatkom Tween-20 deterdženta (TBS-T: 20 mM Tris-HCl pH 7,6; 137 mM NaCl; 0,05% Tween 20). Blokiranje membrane je trajalo oko 60 minuta na sobnoj temperaturi, a rađeno je u cilju smanjivanja intenziteta nespecifičnog vezivanja antitela. Nakon blokiranja membrane su ispirane u TBS-T puferu 10 minuta, koji je zatim odliven i zamenjen rastvorom za blokiranje u koji su dodata primarna antitela. Korišćena su sledeća poliklonska primarna antitela (pored kataloškog broja naznačeno je razblaženje): anti-BDNF (N-20: sc-546, Santa Cruz, 1:500); anti-proBDNF (AB5613, Chemicon, 1:3000); anti-Trk B (sc-12, Santa Cruz, 1:1000); anti-TrkB (phospho Y816) (ab75173, Abcam, 1:1000); anti-NGF (H-20: sc-548, Santa Cruz, 1:500); anti-p-Trk A (E-6: sc-8058, Santa Cruz, 1:2000); anti-p75 (N-20: cs-6189, Santa Cruz, 1:1000); anti-Akt1/2/3 (H-136: sc-8312, Santa Cruz, 1:1500); anti-p-Akt1/2/3 (Thr-308)-R (sc-16646-R, Santa Cruz, 1:3000); anti-p-Akt1/2/3 (Ser-473)-R (sc-7985-R, Santa Cruz,



1:1500); anti-ERK 1 (K-23: sc-94, Santa Cruz, 1:3000); anti-p-ERK (E-4: sc-7383, Santa Cruz, 1:500); anti-sečena kaspaza-3 (Asp175, #9661, Cell Signaling, 1:750); anti-NFkB p65 (C-20: sc-372, Santa Cruz, 1:15000); anti-XIAP (H-202: sc-11456, Santa Cruz, 1:3000); anti-MAP-2 (MAB3418, Chemicon, 1:1500); anti-Drebrin (ab12350, Abcam, 1:1000); anti-GAP-43 (AB5220, Chemicon, 1:10000); anti-Sinaptofizin (poklon od dr Reinhard Jahn, 1:150000); anti-Sinuklein (1:2000); anti-N-kadherin (1:3000); anti- $\beta$ -aktin (A-5060, Sigma, 1:10000); anti-GAPDH (sc-20357, Santa Cruz, 1:2000).

Nakon inkubiranja sa primarnim antitelom membrane su ispirane 3 puta po 10 minuta u TBS-T puferu (da bi se uklonila primarna antitela koja se nisu specifično vezala), i potom dalje inkubirane 60 minuta na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelom (sc-2350, sc-2370, Santa Cruz i P0260, DACO) obeleženim peroksidazom rena. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom, membrane su ispirane 3 puta po 10 minuta u TBST-u, a zatim izložene dejstvu luminola (komercijalni komplet za hemiluminescenciju RNP 2106 Western blotting detection reagents, Amersham). Membrana je inkubirana u substratu 1 minut, očeđena i izložena autoradiografskom filmu osetljivom na plavu svetlost u trajanju od 1 do 5 minuta. Filmovi su razvijeni odmah po završetku ekspozicije membrane i skenirani radi dalje analize.

### **3.8.6. Semikvantitativna analiza imunoblotova**

Intenzitet signala dobijenih na autoradiografskom filmu je kvantifikovan denzitometrijski, korišćenjem kompjuterskog programa za analizu signala (ImageQuant 5.0). Vrednosti dobijene za ciljne proteine su normalizovane u odnosu na vrednosti koje su dobijene za odgovarajući aktin ili GAPDH, koji su bili merilo nanete količine totalnih proteina. Tako dobijene relativne vrednosti su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje.

### 3.9. Fluoro-žad B i Hoechst 33258 histohemijska bojenja i analiza signala

Životinje su žrtvovane 8, 16 i 24 sata nakon inicijalnog injeciranja. Mozgovi su izolovani i stavljeni u fiksativ koga čini 4% paraformaldehid u fosfatnom puferu (*engl.*, phosphate-buffered saline, PBS), pH=7,4. Fiksacija je trajala 24 sata na 4°C. Zatim je urađena dehidracija izlaganjem mozгова rastućim koncentracijama saharoze (10%, 20%, 30%) u PBS-u. Svakom od pomenutih razblaženja saharoze mozgov i su izloženi po 24 sata. Korak dehidracije služi krioprotekciji, tj. sprečava nastanak kristala vode prilikom zamrzavanja tkiva koji bi isto oštetili. Nakon uspešne dehidracije mozgov i su zamrznuti u izopentanolu i ostavljeni na -80 °C do daljeg korišćenja.

Debljina preseka je iznosila 18 µm a uziman je svaki peti koronalni presek. Pločice sa presecima su radi fiksacije ostavljane 24 sata na sobnoj temperaturi i nakon toga (do daljeg korišćenja) ostavljene na -20°C.

Fluoro-žad B boja (Chemicon, AG310) je korišćena za detekciju neurona u procesu neurodegeneracije po protokolu koji su uspostavili Schmued i Hopkins (2000a). Pločice sa suvim presecima se uranjaju 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). Pločice sa presecima su zatim ispirane u destilovanoj vodi (2 minuta) i prebačene u rastvor Fluoro-žad boje gde su držane narednih 20 minuta. 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. Nakon bojenja pločice sa presecima su ispirane 3 puta po 1 minut u destilovanoj vodi. Na preseke je zatim nanet 0,01% rastvor Hoechst 33258 (Acros Organics) u trajanju od 10 minuta. Pločice sa presecima su ispirane 3 puta po 5 minut u destilovanoj vodi, osušene na sobnoj temperaturi i uronjene u ksilol (3 minuta) zbog potpune dehidracije. Nakon toga na pločice sa presecima 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 boje već 0,1% rastvoru sirćetne kiseline. Kao pozitivna kontrola korišćeni su preseci mozgov PND7 životinja koje su tretirane intraperitonealno sa dve doze (+)MK-801 (0,5 mg/kg) sa razmakom od 8 sati;

žrtvovane 24 sata nakon prvog injeciranja i koji su prošli kompletnu proceduru Fluoro-žad bojenja.

Preseci su analizirani pomoću mikroskopa (Axio Observer Microscope Z1, ZEISS) sa odgovarajućim filterom (zeleni) za vizuelizaciju fluorescein ihtiocijanata (FITC). Neuronu u procesu degeneracije koje obeleži Fluoro-žad boja se jasno razlikuju od pozadine jer se vide kao zasebne fluorescentno zelene tačke u odnosu na crnu pozadinu.

Na presecima dobijenim iz mozгова kontrolnih životinja (tretirane fiziološkim rastvorom) i životinja koje su tretirane propofolom su analizirani posteriorna cingulatna/retrosplenialna kora i laterodorzalni talamus u pet reprezentativnih preseka do mozgu (n=3 po grupi).

### **3.10. Statistička obrada podataka**

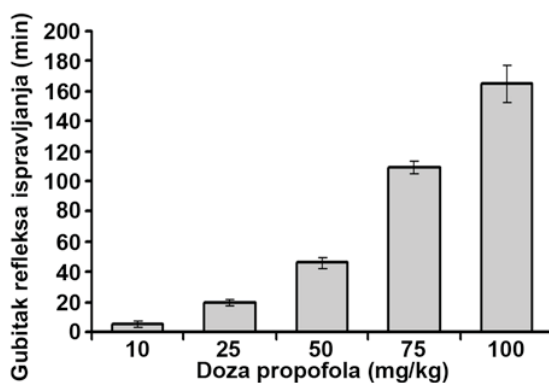
Relativne promene u ekspresiji iRNK i proteina su predstavljene u procentima (srednja vrednost  $\pm$  standardna greška) u odnosu na kontrolnu vrednost kojoj je dodeljena vrednost od 100%. Za statističku analizu dobijenih relativnih vrednosti je korišćen softverski paket STATISTICA 6.0. Nakon provere da li podaci podležu normalnoj distribuciji usledila je dalja sttistička 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. Statistički značajnim razlikama su smatrane one kod kojih je  $p \leq 0,05$  i na graficima su obeležene simbolom \*.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Dozno- i starosno-zavisne studije

#### 4.1.1. Dozno-zavisna studija

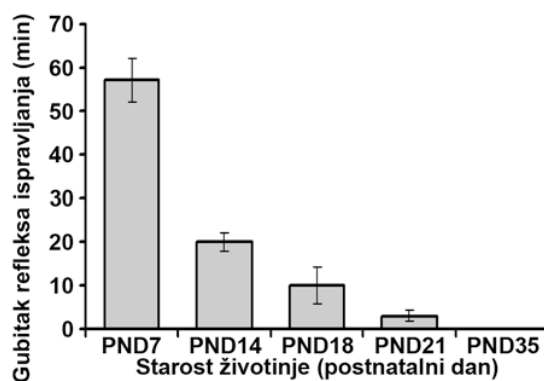
S obzirom na to da su dozno-zavisne studije veoma važne u istraživanjima vezanim za farmakološki aktivne supstance, prvo smo uradili nezavisan eksperiment u cilju određivanja doze propofola koja je sposobna da indukuje efektivnu anesteziju i koja će biti korišćena u daljim istraživanjima. Pacovi stari 14 dana su intraperitonealno injecirani propofolom u dozi 10, 25, 50, 75 ili 100 mg/kg. Životinje koje su primile najnižu dozu propofola (10 mg/kg) su bile ošamućene, ali budne. Ovo je jedina doza koja nije imala uticaj na refleks ispravljanja. Ostale doze su indukovale gubitak refleksa ispravljanja u okviru nekoliko minuta od injiciranja (2-4 min), kao i odsutvo odgovora na bolni stimulus (test štipanja repa). Na slici 15 je prikazan period odsustva refleksa ispravljanja. Doze propofola od 25 i 50 mg/kg nisu dovele do promene boje kože niti do nepravilnog disanja. Nijedna životinja nije uginula u ovim eksperimentima. Na osnovu ovih i prethodnih istraživanja naše grupe na PND7 pacovima, u svim daljim ispitivanjima je odabrana doza propofola od 25 mg/kg koja je kod PND14 pacova indukovala gubitak refleksa ispravljanja u trajanju od  $20 \pm 2$  minuta.



Slika 15. **Dozno-zavisni odgovor PND14 pacova.** Gubitak refleksa ispravljanja je meren na pacovima koji su primili propofol u dozi 10, 25, 50, 75 ili 100 mg/kg.

#### 4.1.2. Starosno-zavisna studija

Nakon što je izabrana optimalna doza propofola, životinje različite starosti su tretirane propofolom u dozi 25 mg/kg (slika 16). Ova doza je indukovala gubitak refleksa ispravljanja samo kod PND7, PND14 i PND18 životinja (oko 60, 20 i 9 min, redom). PND21 pacovi su bili duboko sedirani, ošamućeni, ali su pokazivali refleks ispravljanja u trajanju nekoliko minuta (oko 2-3 min). Ova doza propofola nije imala nikakav uticaj na životinje stare 35 dana.



Slika 16. Starosno-zavisni odgovor pacova na dozu propofola 25 mg/kg. Gubitak refleksa ispravljanja je meran na pacovima koji su stari 7, 14, 18, 21 i 35 dana.

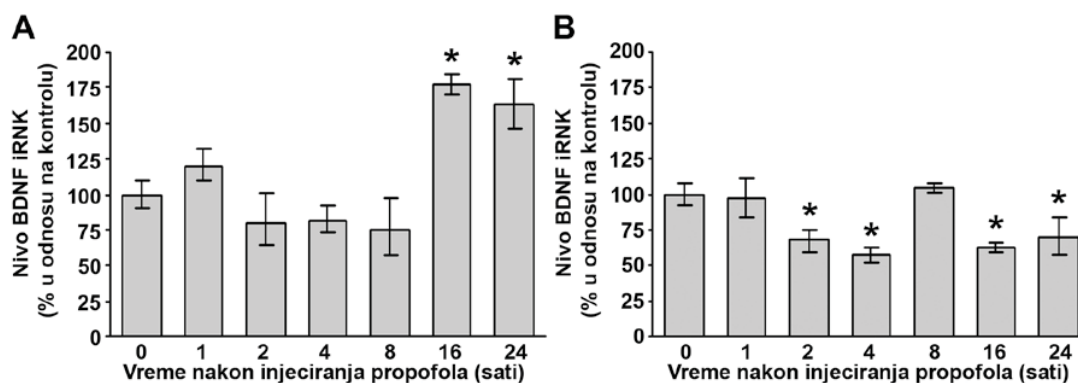
#### 4.2. Uticaj propofolskog tretmana na signalni put neurotrofina u kori i talamusu PND14 pacova

##### 4.2.1. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju ukupne iRNK za BDNF u kori i talamusu PND14 pacova

U cilju ispitivanja uticaja propofolskog tretmana na neurotrofinsku signalizaciju prvo smo ispratili promene u ekspresiji ukupne iRNK za BDNF u dve strukture mozga koje su odgovorne za delovanje anestetika: u kori i talamusu. U kori PND14 pacova metodom RT-PCR-a u realnom vremenu nisu detektovane promene u ekspresiji ukupne iRNK za BDNF u poređenju sa kontrolnim vrednostima tokom prvih 8 sati nakon tretmana. Nakon tog perioda, tretman je indukovao statistički značajan porast u

ekspresiji iRNK za BDNF (~75% u poređenju sa kontrolnom vrednošću) u 16. i 24. satu (slika 17A, \* $p < 0,05$ ).

U talamusu je detektovano smanjenje u ekspresiji iRNK za BDNF (~40% u poređenju sa kontrolnim vrednostima) u 2. i 4. satu nakon propofolskog tretmana. U 8. satu, nivo iRNK za BDNF se vratio na kontrolnu vrednost, dok je u 16. i 24. satu ponovo detektovan pad u ekspresiji iRNK za BDNF (~30% u poređenju sa kontrolnom vrednošću) (slika 17B, \* $p < 0,05$ ).



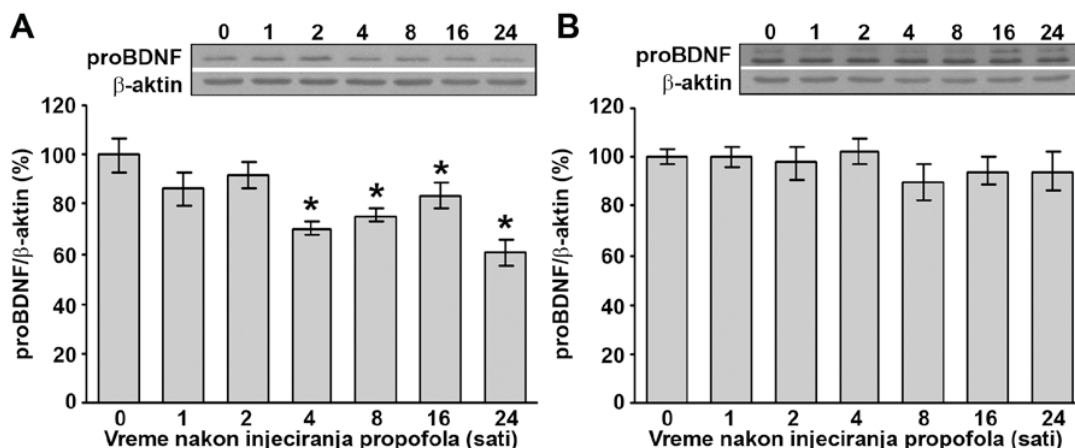
Slika 17. **Propofolski tretman različito utiče na ekspresiju iRNK za BDNF u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova.** Nivo ekspresije iRNK za BDNF praćen je metodom RT-PCR u realnom vremenu u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Ekspresija iRNK za BDNF je normalizovana u odnosu na ekspresiju iRNK za GAPDH. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti  $\pm$  SEM u odnosu na kontrolni uzorak (0 sati), koji je arbitrarno određen kao 100 %. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

#### 4.2.2. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju proBDNF proteina u kori i talamusu PND14 pacova

U kori Western blot metodom nisu detektovane značajne promene u ekspresiji proBDNF proteina (32 kDa) sve do 4. sata nakon tretmana kada je zapažen statistički značajan pad (20-40%) koji se održao do kraja ispitivanog perioda (slika 18A, \* $p < 0,05$ ).

Za razliku od kore, propofolski tretman nije uticao na ekspresiju proBDNF proteina u talamusu (slika 18B, \* $p < 0,05$ ).

Jednofaktorska ANOVA je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka samo u kori ( $F(6, 28)=7,082, p=0,001$ ).



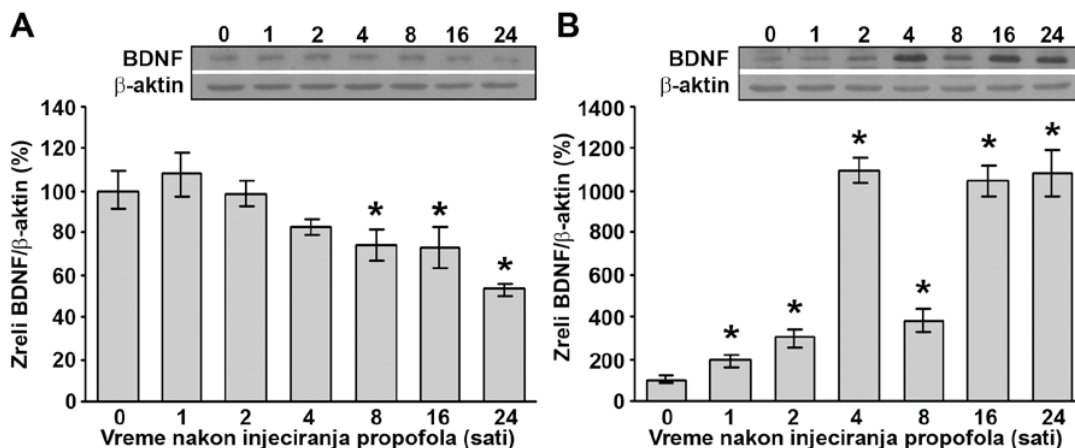
Slika 18. Propofolski tretman različito utiče na ekspresiju proBDNF proteina u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije proBDNF proteina (32 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu β-aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti ± SEM ( $n=5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

#### 4.2.3. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju zrelog BDNF proteina u kori i talamusu PND14 pacova

Nakon propofolskog tretmana Western blot metodom detektovan je statistički značajan pad u ekspresiji zrelog BDNF proteina (14 kDa) u kori (slika 19A), dok je statistički značajan porast detektovan u talamusu (slika 19B) PND14 pacova. Pad u ekspresiji zrelog BDNF proteina u kori je detektovan tek u 8. satu nakon propofolskog tretmana (~25% u poređenju sa kontrolnom vrednošću). Ovaj trend se zadržao do 24. sata, kada je zabeležen najveći pad (~50% u poređenju sa kontrolnom vrednošću) (slika 19A, \* $p < 0,05$ ).

U talamusu je ekspresija zrelog BDNF proteina imala suprotan profil u odnosu na koru. Dvostruki porast u ekspresiji zrelog BDNF proteina detektovan je već u 1. satu nakon tretmana. Znatno veći porasti u ekspresiji zrelog BDNF proteina (~10 puta) su detektovani u 4., 16. i 24. satu nakon tretmana (slika 19B, \* $p < 0,05$ ).

Statističke analize su su pokazale da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka u kori (jednofaktorska ANOVA:  $F(6, 28)=6,497$ ,  $p=0,001$ ) i u talamusu (Kruskal-Valis ANOVA:  $H(6, N=56) = 46,671$ ,  $p=0,001$ ).



Slika 19. Propofolski tretman različito utiče na ekspresiju zrelog BDNF proteina u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije zrelog BDNF proteina (14 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu  $\beta$ -aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

Na osnovu rezultata koji se odnose na promene u ekspresiji BDNF iRNK i proteina (pro i zrele izoforme) možemo zaključiti da iRNK i proteini nisu u korelaciji što može ukazati na brzi promet BDNF-a koji se odnosi na njegovu redistribuciju iz kore ka drugim strukturama i iz drugih struktura ka talamusu. Takođe, možemo pretpostaviti da tretman propofolom brzo reguliše BDNF na posttranslacionom nivou, međutim ovaj proces treba dublje istražiti, naročito što u ovom istraživanju nisu ispraćeni enzimi koji obrađuju pro forme neurotrofina do zrelih.

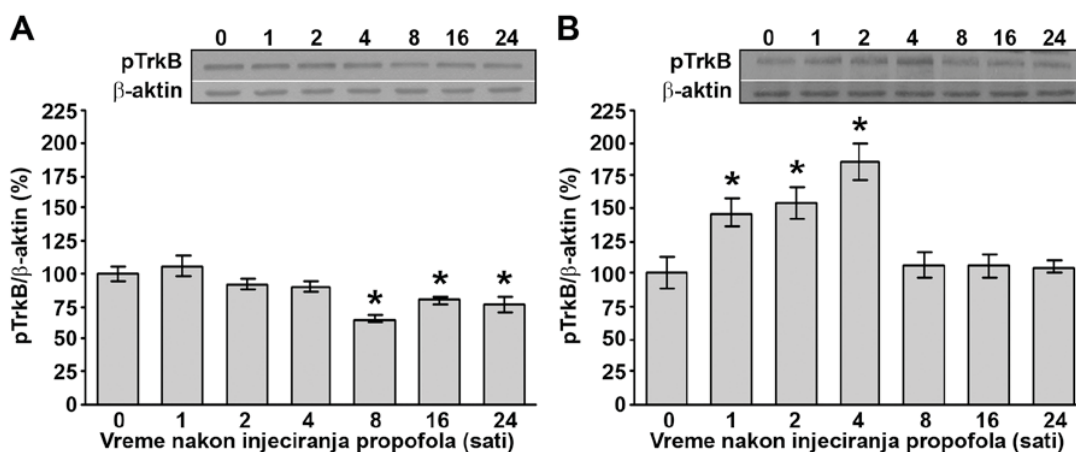


#### 4.2.4. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju fosforilisanog TrkB proteina u kori i talamusu PND14 pacova

S obzirom na to da smo pokazali da propofolski tretman utiče na zastupljenost zrelog BDNF proteina na vremenski- i regionalno-zavisan način, dalje smo hteli da ispitamo da li se ove promene odražavaju na zastupljenost njegovog aktiviranog (fosforilisanog) receptora, pTrkB. U kori Western blot metodom nisu detektovane značajne promene u ekspresiji pTrkB proteina (140 kDa) sve do 8. sata nakon tretmana, kada je zapažen statistički značajan pad (20-40%) koji se održao do kraja ispitivanog perioda (slika 20A, \* $p < 0,05$ ).

Za razliku od kore, propofolski tretman je povećao ekspresiju pTrkB proteina u talamusu u periodu 1-4 sata nakon tretmana (50-80%). Međutim, tokom perioda 8-24 sata, ekspresija pTrkB proteina je bila stabilna i jednaka kontrolnoj vrednosti (slika 20B, \* $p < 0,05$ ).

Statistička analiza (jednofaktorska ANOVA) je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka u obe ispitivane strukture (kora:  $F(6, 28) = 8,321$ ,  $p = 0,001$ ; talamus:  $F(6, 35) = 9,474$ ,  $p = 0,001$ ).



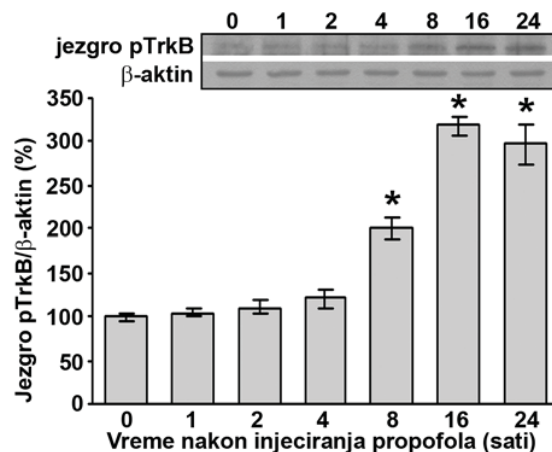
Slika 20. Propofolski tretman različito utiče na ekspresiju fosforilisanog TrkB proteina u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije fosforilisanog TrkB proteina (140 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu β-aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti ± SEM ( $n = 5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom

grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

#### 4.2.5. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju jezgra fosforilisanog TrkB proteina u kori PND14 pacova

Pored ekspresije fosforilisanog TrkB proteina, ispratili smo i ekspresiju jezgra pTrkB. Jezgro Trk receptora predstavljaju fosforilisane, ali ne i glikozilovane forme koje nisu eksprimirane na površini ćelije i koje imaju nižu molekulsku težinu (80 kDa) u odnosu na receptor eksprimiran na površini ćelije (140 kDa). U kori Western blot metodom nisu detektovane statistički značajne promene u ekspresiji jezgra pTrkB proteina (80 kDa) sve do 8 sati nakon tretmana kada je zapažen statistički značajan dvostruki porast. U 16. i 24. satu su detektovani trostruki porasti u ekspresiji jezgra pTrkB proteina (slika 21, \* $p < 0,05$ ). Za razliku od kore, u talamusu nije detektovana ova proteinska traka.

Jednofaktorska ANOVA je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka u kori ( $F(6, 28)=65,082, p=0,001$ ).

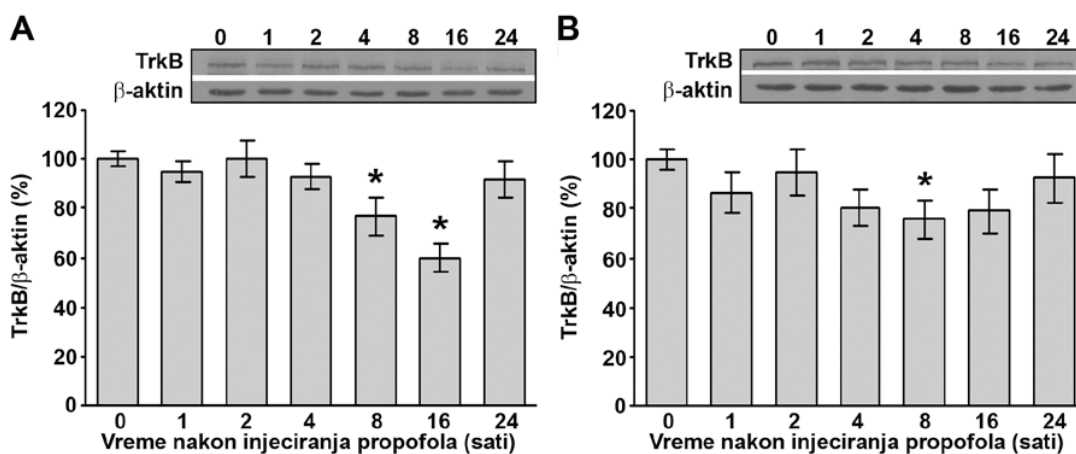


Slika 21. Propofolski tretman različito utiče na ekspresiju jezgra fosforilisanog TrkB proteina u kori PND14 pacova. Nivo ekspresije jezgra fosforilisanog TrkB proteina (80 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu β-aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

#### 4.2.6. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju ukupnog TrkB proteina u kori i talamusu PND14 pacova

Nakon propofolskog tretmana Western blot metodom detektovan je statistički značajan pad u ekspresiji ukupnog TrkB proteina (140 kDa) u obe ispitivane strukture. U kori je detektovan statistički značajan pad (25-40%) u ekspresiji ukupnog TrkB proteina u 8. i 16. satu nakon tretmana (slika 22A, \* $p < 0,05$ ), dok je u talamusu detektovan pad (~25%) samo u 8. satu nakon tretmana (slika 22B, \* $p < 0,05$ ).

Statistička analiza (jednofaktorska ANOVA) je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka u kori ( $F(6, 49)=6,524$ ,  $p=0,001$ ), dok je u talamusu *post hoc* analizom (LSD test) pokazan značajan efekat vremena samo u 8. satu nakon tretmana (\* $p < 0,05$ ).



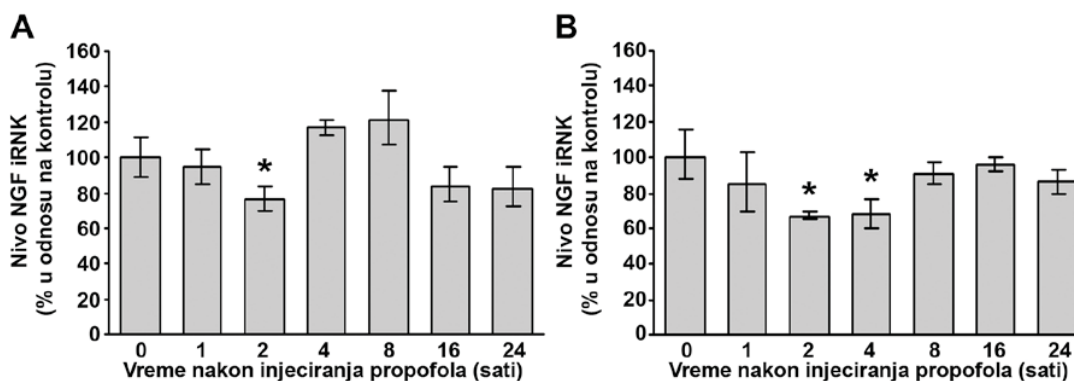
Slika 22. Propofolski tretman smanjuje ekspresiju ukupnog TrkB proteina u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije ukupnog TrkB proteina (140 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu  $\beta$ -aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

Na osnovu rezultata koji se odnose na promene u ekspresiji zrelog BDNF-a i pTrkB receptora možemo zaključiti da su promene u ekspresiji zrelog BDNF-a delimično praćene istim promenama u aktivnosti TrkB receptora. U skladu sa

rezultatima za ukupni TrkB, pTrkB i jezgro pTrkB receptora, možemo pretpostaviti da u kori dolazi i do deglikozilacije ovog receptora, što nije slučaj sa talamusom. Međutim, do danas ne postoje podaci o uticaju opštih anestetika na glikozilaciju Trk receptora.

#### 4.2.7. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju ukupne iRNK za NGF u kori i talamusu PND14 pacova

Drugi protein iz familije neurotrofina, koji je predmet istraživanja ove disertacije je NGF. Ekspresija ukupne iRNK za NGF u kori nije promenjena u odnosu na kontrolu vrednost osim u 2. satu nakon tretmana, kada je detektovan pad (~25%; slika 23A, \* $p < 0,05$ ). U talamusu, propofolski tretman je smanjio ekspresiju ukupne iRNK za NGF samo u 2. i 4. satu (~30%), nakon čega su u daljim ispitivanim vremenskim tačkama vrednosti bile jednake kontrolnim (slika 23B, \* $p < 0,05$ ).



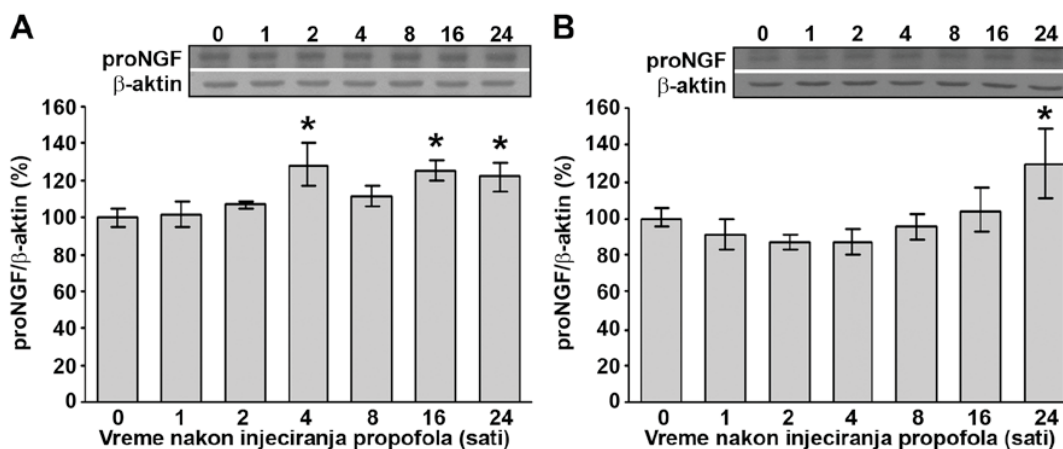
Slika 23. Propofolski tretman smanjuje ekspresiju iRNK za NGF u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije iRNK za NGF praćen je metodom RT-PCR u realnom vremenu u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Ekspresija iRNK za NGF je normalizovana u odnosu na ekspresiju iRNK za GAPDH. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti  $\pm$  SEM u odnosu na kontrolni uzorak (0 sati), koji je arbitrarno određen kao 100 %. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

#### 4.2.8. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju proNGF proteina u kori i talamusu PND14 pacova

U kori Western blot metodom je detektovan porast u ekspresiji proNGF proteina (proB 27 kDa) u 4., 16. i 24. satu nakon propofolskog tretmana (slika 24A, \* $p < 0,05$ ).

Ekspresija proNGF proteina u talamusu se nije menjala sve do 24. sata nakon tretmana kada je detektovan porast (~30%) u odnosu na kontrolnu vrednost (slika 24B, \* $p < 0,05$ ).

Jednofaktorska ANOVA je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka u obe ispitivane strukture (kora:  $F(6, 28)=2,748$ ,  $p=0,032$ ; talamus:  $F(6, 28)=2,229$ ,  $p=0,047$ ).

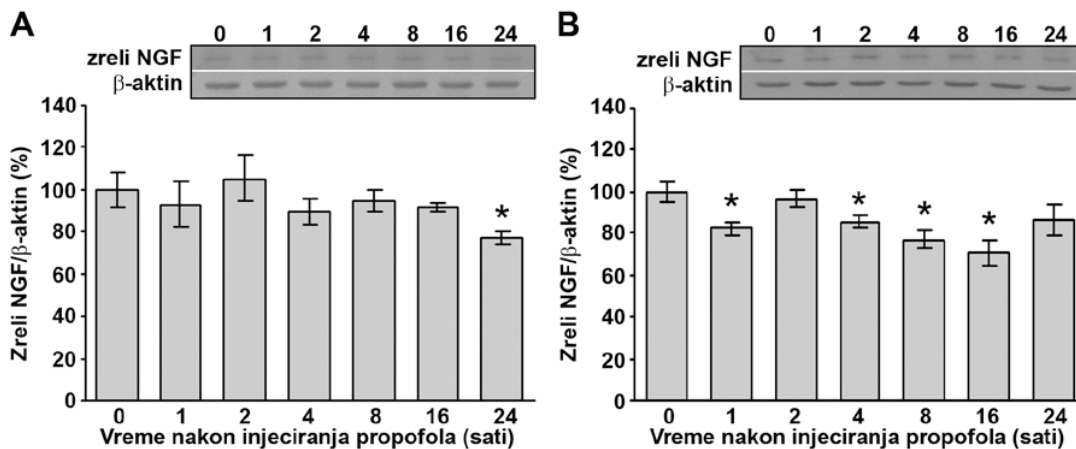


Slika 24. Propofolski tretman povećava ekspresiju proNGF proteina u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije proNGF proteina (27 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu β-aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti ± SEM ( $n = 5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

#### 4.2.9. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju zrelog NGF proteina u kori i talamusu PND14 pacova

Nakon propofolskog tretmana Western blot metodom detektovan je statistički značajan pad u ekspresiji zrelog NGF proteina (14 kDa) u obe ispitivane strukture. U kori ekspresija zrelog NGF proteina je bila jednaka kontrolnoj vrednosti u svim vremenskim tačkama osim u 24. satu nakon tretmana, kada je detektovan statistički značajan pad (~25%) (slika 25A, \* $p < 0,05$ ). U talamusu je detektovan smanjeni nivo zrelog NGF proteina (20-30%) u svim ispitivanim vremenskim tačkama, osim u 2. i 24. satu nakon tretmana (slika 25B, \* $p < 0,05$ ).

Jednofaktorska ANOVA je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka samo u talamusu ( $F(6, 28)=4,23$ ,  $p=0,004$ ), dok je u kori *post hoc* analizom (LSD test) pokazan značajan efekat vremena samo u 24. satu nakon tretmana ( $*p<0,05$ ).



Slika 25. Propofolski tretman smanjuje ekspresiju zrelog NGF proteina u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije zrelog NGF proteina (14 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu  $\beta$ -aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti  $\pm$  SEM ( $n=5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

Na osnovu rezultata koji se odnose na promene u ekspresiji NGF iRNK i proteina (pro i zrele izoforme) možemo zaključiti da između profila iRNK i proteina dolazi do neslaganja, što bi moglo da ukaže da promene u nivoima ispitivanih proteina u jednom regionu mogu nastati iz neuronskih projekcija ka tom regionu, a ne od neurona iz tog ispitivanog regiona.

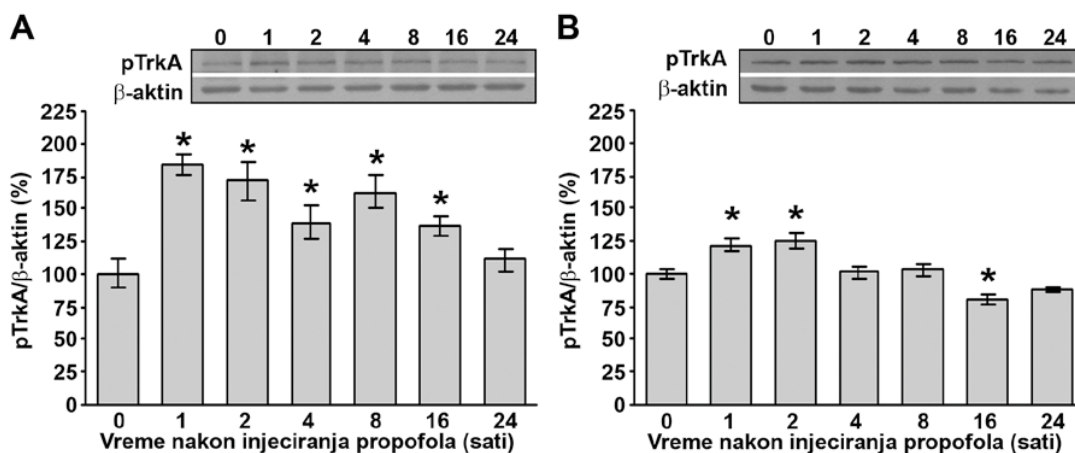
#### 4.2.10. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju fosforilisanog TrkA proteina u kori i talamusu PND14 pacova

S obzirom na to da smo pokazali da propofolski tretman smanjuje zastupljenost zrelog NGF proteina na vremenski-zavisani način, dalje smo hteli da ispitamo da li se

ove promene odražavaju na zastupljenost njegovog odgovarajućeg fosforilisanog receptora (pTrkA, 140 kDa). U kori propofolski tretman je povećao ekspresiju pTrkA (40-85% u odnosu na kontrolnu vrednost) u periodu 1-16 sati nakon tretmana (slika 26A, \* $p < 0,05$ ).

U talamusu je detektovan blagi porast (~25%) u ekspresiji pTrkA proteina u 1. i 2. satu nakon tretmana. U periodu 4-24 sata nakon tretmana ekspresija pTrkA proteina je bila jednaka kontrolnoj vrednosti, uprkos prolaznom smanjenju koje je detektovano u 16. satu (slika 26B, \* $p < 0,05$ ).

Jednofaktorska ANOVA je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka u obe ispitivane strukture (kora:  $F(6, 42)=7,939$ ,  $p=0,001$ ; talamus:  $F(6, 35)=14,956$ ,  $p=0,001$ ).



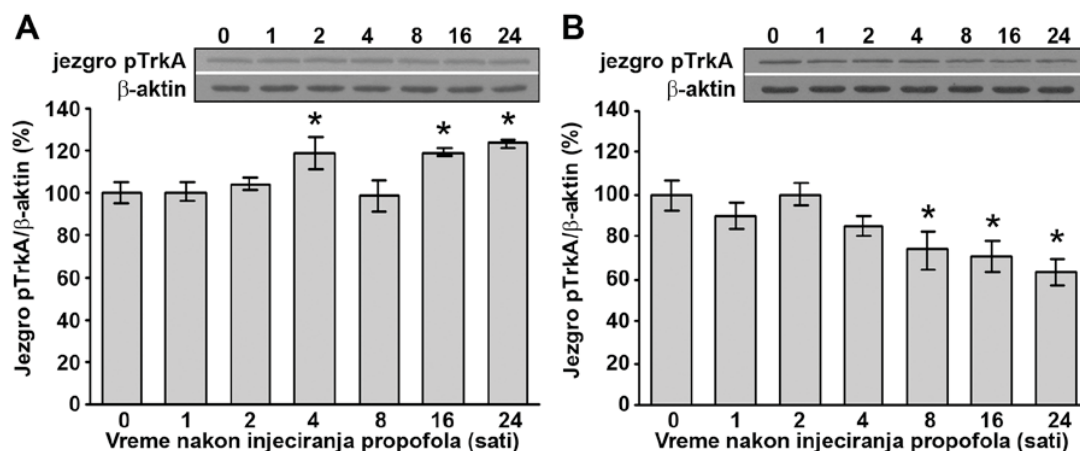
Slika 26. Propofolski tretman povećava ekspresiju fosforilisanog TrkA proteina u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije fosforilisanog TrkA proteina (140 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu β-aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

#### 4.2.11. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju jezgra fosforilisanog TrkA proteina u kori i talamusu PND14 pacova

U kori Western blot metodom je detektovan porast u ekspresiji jezgra pTrkA proteina (80 kDa) u 4., 8. i 16. satu nakon propofolskog tretmana (slika 27A, \* $p < 0,05$ ).

Za razliku od kore, propofolski tretman je smanjio ekspresiju jezgra pTrkA proteina u talamusu. U talamusu, ekspresija jezgra pTrkA proteina se nije menjala do 8 sati nakon tretmana. Međutim, tokom perioda 8-24 sata, propofolski tretman je smanjio zastupljenost pTrkB proteina (25-40%) (slika 27B, \* $p < 0,05$ ).

Jednofaktorska ANOVA je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka u obe ispitivane strukture (kora:  $F(6, 14)=10,277$ ,  $p=0,001$ ; talamus:  $F(6, 14)=8,418$ ,  $p=0,001$ ).



Slika 27. Propofolski tretman različito utiče na ekspresiju jezgra fosforilisanog TrkA proteina u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije jezgra fosforilisanog TrkA proteina (80 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu β-aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti  $\pm$  SEM ( $n=5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

Na osnovu rezultata koji se odnose na promene u ekspresiji zrelog NGF-a i pTrkA receptora možemo zaključiti da promene u ekspresiji NGF-a nisu uticale na aktivnost TrkA receptora. U skladu sa rezultatima za pTrkA i jezgro pTrkA receptora, možemo pretpostaviti da propofol na regionalno-specifičan način utiče na glikozilaciju TrkA receptora.

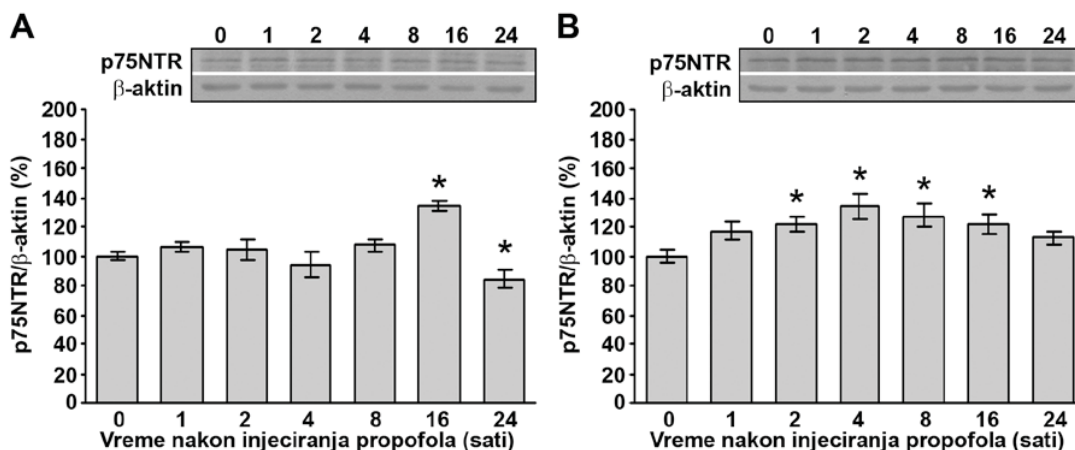


#### 4.2.12. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju p75 receptora u kori i talamusu PND14 pacova

U kori propofolski tretman nije uticao na ekspresiju p75 receptora (75 kDa) do 16. sata, kada je detektovan porast (40%). Međutim, u 24. satu nakon tretmana detektovan je statistički značajan pad u ekspresiji p75 receptora (~20%; slika 28A, \* $p < 0,05$ ).

U talamusu, maksimalni porast u ekspresiji p75 receptora je zabeležen u 4. satu nakon tretmana (~40%). Nakon ove vremenske tačke ekspresija p75 receptora počinje da opada i u 24. satu nakon tretmana dostiže kontrolnu vrednost (slika 28B, \* $p < 0,05$ ).

Jednofaktorska ANOVA je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka u obe ispitivane strukture (kora:  $F(6, 28)=7,977$ ,  $p=0,001$ ; talamus:  $F(6, 28)=2,993$ ,  $p=0,022$ ).

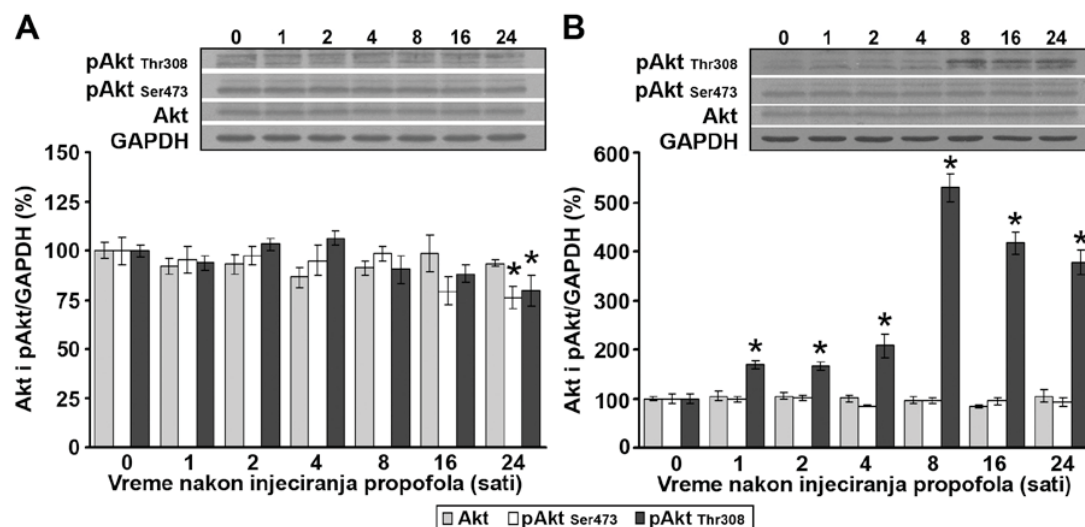


Slika 28. Propofolski tretman različito utiče na ekspresiju p75 receptora u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije p75 receptora (75 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu  $\beta$ -aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

#### 4.2.13. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju ukupnih i fosforilanih Akt proteina u kori i talamusu PND14 pacova

S obzirom da smo pokazali da propofolski tretman utiče na aktivaciju neurotrofinskih receptora na vremenski- i regionalno-zavisan način, dalje smo hteli da ispitamo da li se ove promene odražavaju na nishodne kinaze, tj. na zastupljenost ukupnih i fosforilanih Akt proteina (55/60 kDa). Propofolski tretman nije uticao na ekspresiju ukupnih Akt proteina u kori (slika 29A). Zastupljenost pAkt (Thr308 i Ser473) se nije menjala sve do 24. sata nakon tretmana kada je detektovan pad (~25%) u odnosu na kontrolnu vrednost (slika 29A, \* $p < 0,05$ ). Bez obzira na to što je LSD test pokazao značajnost, jednofaktorska ANOVA nije detektovala vreme nakon tretmana kao značajan faktor za analizu podataka.

U talamusu propofolski tretmana nije uticao na ekspresiju ukupnih Akt proteina, niti na ekspresiju pAkt Ser473 proteina (slika 29B). Za razliku od toga, statistički značajan porast u ekspresiji pAkt Thr308 je detektovan u svim vremenskim tačkama nakon tretmana. Najveći porast (4-5 puta) je detektovan u talamusu tokom period 16-24 sati nakon tretmana (slika 29B, \* $p < 0,05$ ). Kruskal-Valis ANOVA je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka ( $H(6, N=21) = 18,944, p = 0,004$ ).



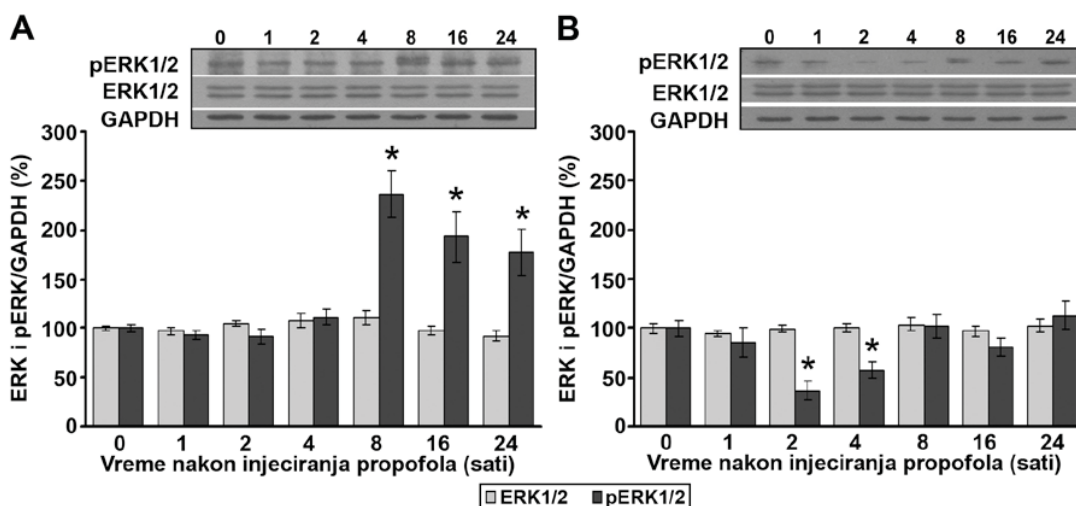
Slika 29. Propofolski tretman različito utiče na ekspresiju ukupnih i fosforilanih Akt proteina u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije ukupnih i fosforilanih Akt proteina (55/60 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet

traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu GAPDH. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti  $\pm$  SEM ( $n=5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

#### 4.2.14. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju ukupnih i fosforilanih ERK1/2 proteina u kori i talamusu PND14 pacova

Druga nishodna kinaza koja ima važnu ulogu u signalnom putu neurotrofina je ERK1/2. Western blot metodom je pokazano da propofolski tretman ne utiče na ekspresiju ukupnih ERK1/2 proteina (42/44 kDa) u kori (slika 30A). Za razliku od toga, povećana ekspresija (2-2,5 puta) aktivnih, tj. fosforilanih kinaza (pERK1/2) je detektovana u istoj strukturi tokom perioda 8-24 časa nakon tretmana (slika 30A, \* $p < 0,05$ ) (Kruskal-Valis ANOVA:  $H(6, N=35) = 26,149, p = 0,002$ ).

Kao i u kori, u talamusu propofolski tretman nije uticao na ekspresiju ukupnih ERK1/2 proteina (slika 30B). Sa druge strane, u istoj strukturi je detektovan drastičan pad u ekspresiji pERK1/2 proteina (40-60%) u 2. i 4. satu nakon tretmana (slika 30B, \* $p < 0,05$ ) (jednofaktorska ANOVA:  $F(6, 21) = 5,732, p = 0,001$ ).



Slika 30. Propofolski tretman različito utiče na ekspresiju ukupnih i fosforilanih ERK1/2 proteina u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije ukupnih i fosforilanih ERK1/2 proteina (42/44 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu GAPDH.

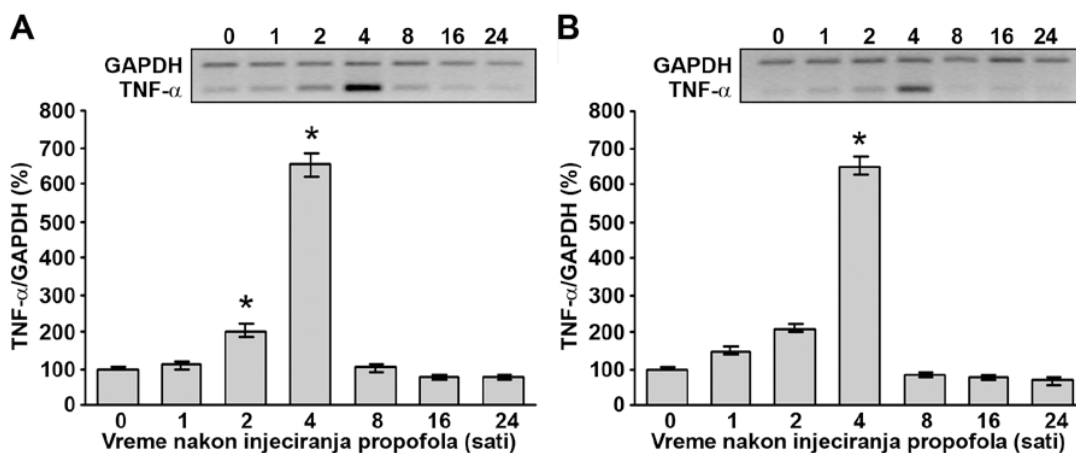
Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

### 4.3. Uticaj propofolskog tretmana na markere inflamacije i apoptoze u kori i talamusu PND14 pacova

#### 4.3.1. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju iRNK za TNF- $\alpha$ u kori i talamusu PND14 pacova

U drugom delu ove disertacije bavili smo se ispitivanjem potencijala propofola da izazove apoptotsku neurodegeneraciju u mozgu PND14 pacova. U tom smislu smo, između ostalog, ispitivali promene u ekspresiji jednog od markera inflamacije, TNF- $\alpha$ . Ispitivane su promene na nivou iRNK. U kori metodom RT-PCR-a detektovan je dvostruki porast u ekspresiji iRNK za TNF- $\alpha$  u 2. satu, kao i šestostruki porast u 4. satu nakon tretmana (slika 31A, \* $p < 0,05$ ). U ostalim ispitivanim vremenskim tačkama u kori, ekspresija iRNK za TNF- $\alpha$  je bila jednaka kontrolnoj vrednosti.

U talamusu je ekspresija iRNK za TNF- $\alpha$  imala gotovo identičan profil kao u kori, sa tom razlikom da je statistički značajan šestostruki porast u ekspresiji iRNK za TNF- $\alpha$  detektovan samo u 4. satu nakon tretmana (slika 31B, \* $p < 0,05$ ).



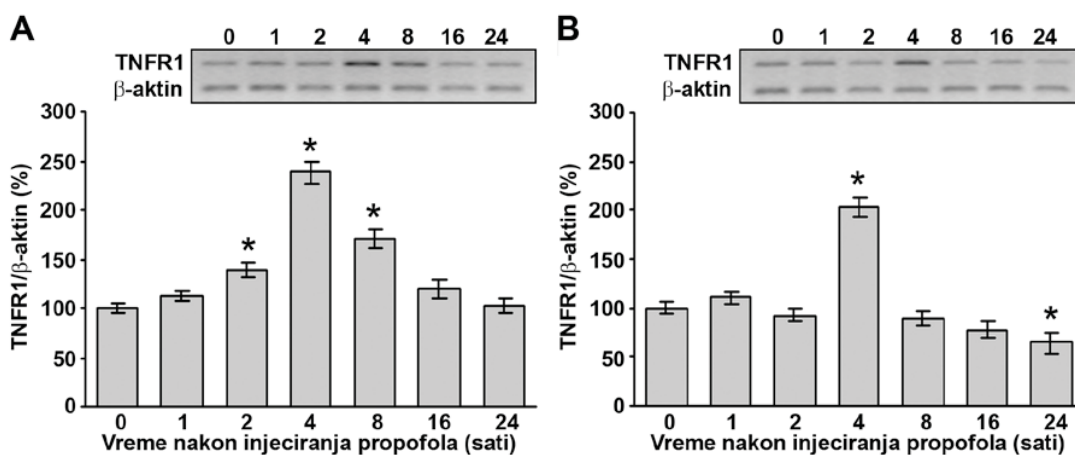
Slika 31. Propofolski tretman povećava ekspresiju iRNK za TNF- $\alpha$  u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije iRNK za TNF- $\alpha$  praćen je RT-PCR metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu GAPDH. Rezultati su izraženi kao

srednja vrednost relativne zastupljenosti  $\pm$  SEM u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni gel. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

#### 4.3.2. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju iRNK za TNFR1 u kori i talamusu PND14 pacova

S obzirom na to da smo pokazali da propofolski tretman povećava zastupljenost iRNK za TNF- $\alpha$ , dalje smo hteli da ispitamo da li su ove promene povezane sa promenama u zastupljenosti iRNK za TNFR1 receptor. U kori RT-PCR metodom je detektovan porast u ekspresiji iRNK za TNFR1 u periodu 2-8 sati nakon tretmana (40-150%) (slika 32A, \* $p < 0,05$ ).

U talamusu propofolski tretman nije uticao na ekspresiju iRNK za TNFR1, osim u 4. satu, kada je detektovan prolazni dvostruki porast, i u 24. satu kada je detektovan pad u iRNK za TNFR1 (~30%) (slika 32B, \* $p < 0,05$ ).



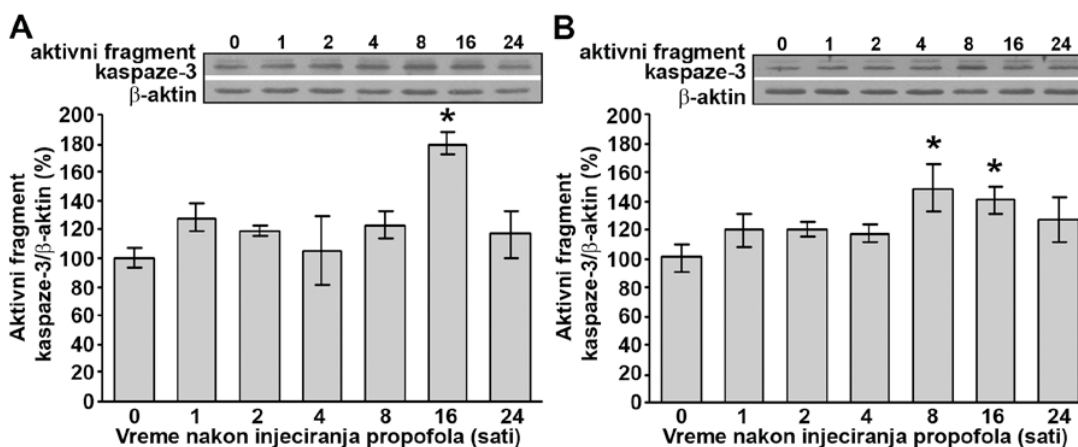
Slika 32. Propofolski tretman povećava ekspresiju iRNK za TNFR1 u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije iRNK za TNFR1 praćen je RT-PCR metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu  $\beta$ -aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti  $\pm$  SEM u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni gel. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

### 4.3.3. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju aktivnog fragmenta kaspaze-3 u kori i talamusu PND14 pacova

U cilju procene potencijalnih neurotoksičnih posledica primene propofola u našem eksperimentalnom modelu u daljem radu smo pratili promene u ekspresiji aktivnog fragmenta kaspaze-3, koja se često koristi kao apoptotski marker. U kori Western blot metodom je pokazano da propofolski tretman ne utiče na ekspresiju aktivnog fragmenta kaspaze-3 (17/19 kDa) osim u 16. satu nakon tretmana, kada je detektovan porast (~80%) (slika 33A, \* $p < 0,05$ ).

U talamusu, propofolski tretman je povećao ekspresiju aktivnog fragmenta kaspaze-3 samo u 8. i 16. satu (~50%). U ostalim ispitivanim vremenskim tačkama nivo aktivnog fragmenta kaspaze-3 je bio jednak kontrolnoj vrednosti (slika 33B, \* $p < 0,05$ ).

Jednofaktorska ANOVA je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka u kori ( $F(6, 21)=4,217, p=0,006$ ), što se ne može reći za talamus mada je *post hoc* analiza (LSD test) podataka dobijenih za ovu strukturu pokazala značajan efekat vremena u 8. i 16. satu nakon tretmana (\* $p < 0,05$ ).



Slika 33. Propofolski tretman različito povećava ekspresiju aktivnog fragmenta kaspaze-3 u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije aktivnog fragmenta kaspaze-3 (17/19 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet trake određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu  $\beta$ -aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

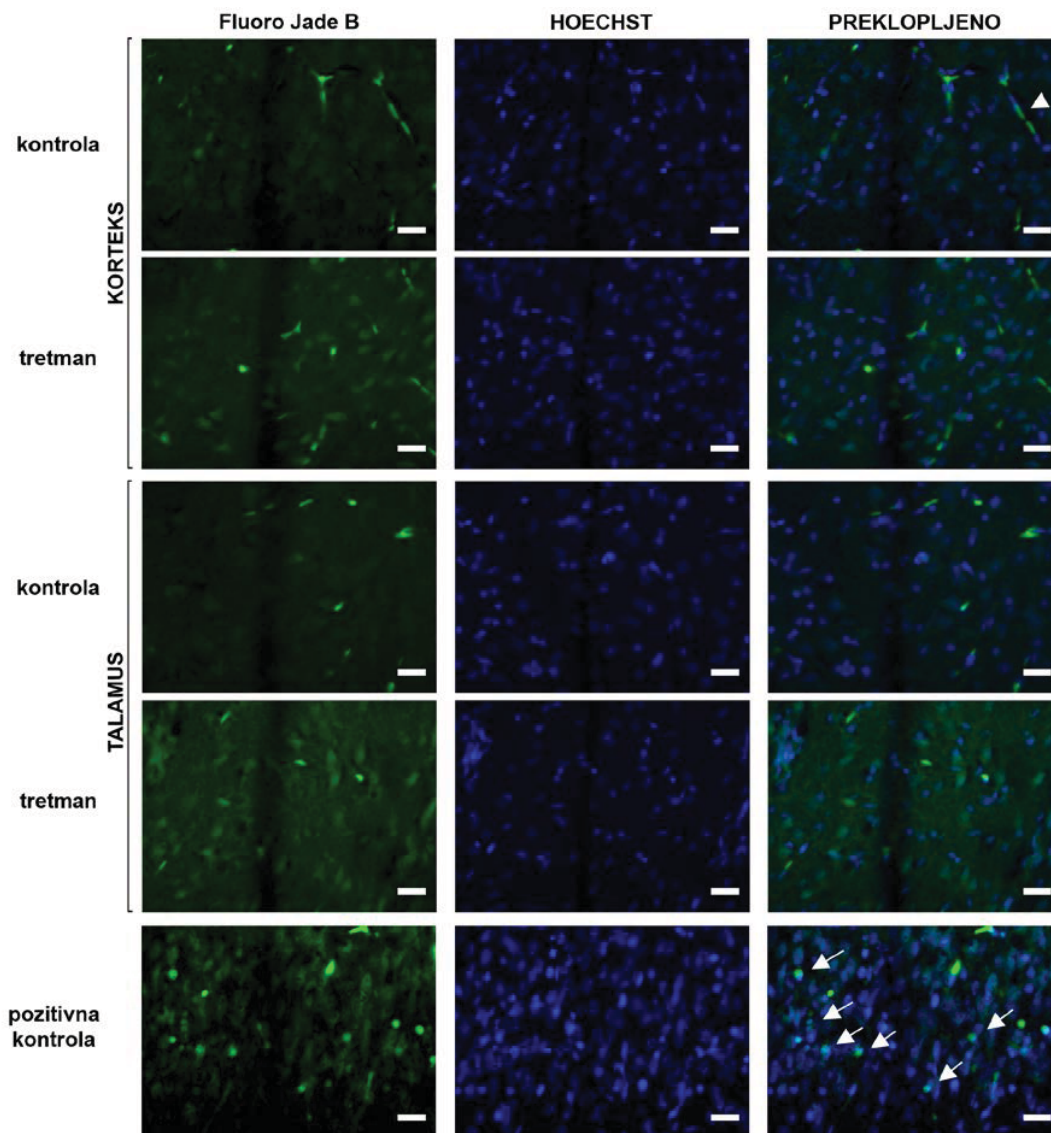
#### **4.3.4. Detekcija neurodegeneracije Fluoro-žad B i Hoechst bojama u kori i talamusu PND14 pacova nakon propofolskog tretmana**

S obzirom na to da je Western blot metodom detektovan porast u zastupljenosti aktivnog fragmenta kaspaze-3 u obe ispitivane strukture u 16. satu nakon propofolskog tretmana u dozi od 25 mg/kg, dalje smo hteli da istražimo da li u ovoj vremenskoj tački mogu da se detektuju i neurodegenerativne promene na histološkom nivou. Međutim, Fluoro-žad B pozitivne ćelije nisu otkrivene na presecima mozгова ni u kori, ni u talamusu kontrolnih (slika 34, prvi i treći red) ili tretiranih (slika 34, drugi i četvrti red) životinja. Isti rezultat je dobijen i na presecima mozгова životinja koje su dekapitovane u 8. i 24. satu nakon injeciranja propofola (rezultati nisu prikazani).

#### **4.3.5. Detekcija neurodegeneracije Fluoro-žad B i Hoechst bojama u kori i talamusu PND14 pacova nakon različitih doza propofola**

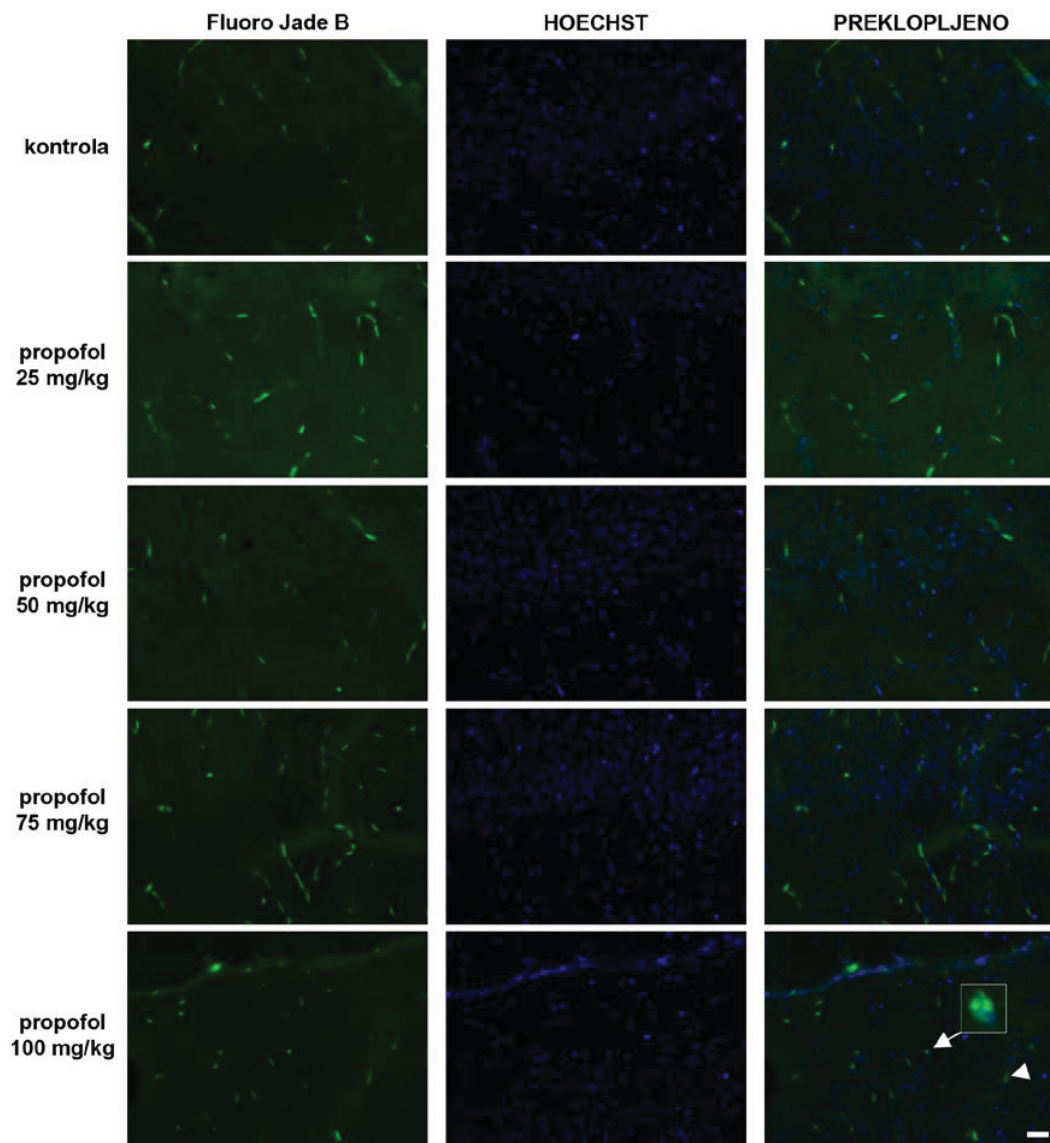
U cilju određivanja doze propofola koja kod PND14 pacova indukuje neurodegeneraciju, uradili smo nezavisan Fluoro-žad B eksperiment na pacovima podeljenim u 5 grupa: kontrolna i tretirana propofolom u dozama 25, 50, 75 ili 100 mg/kg. Životinje su žrtvovane 16 sati nakon tretmana.

Degenerišući neuroni nisu detektovani ni u kori (slika 35), ni u talamusu (slika 36) ispitivanih grupa, osim grupe tretirane propofolom u dozi 100 mg/kg gde je detektovana jedna ćelija u degeneraciji po ispitivanoj strukturi.

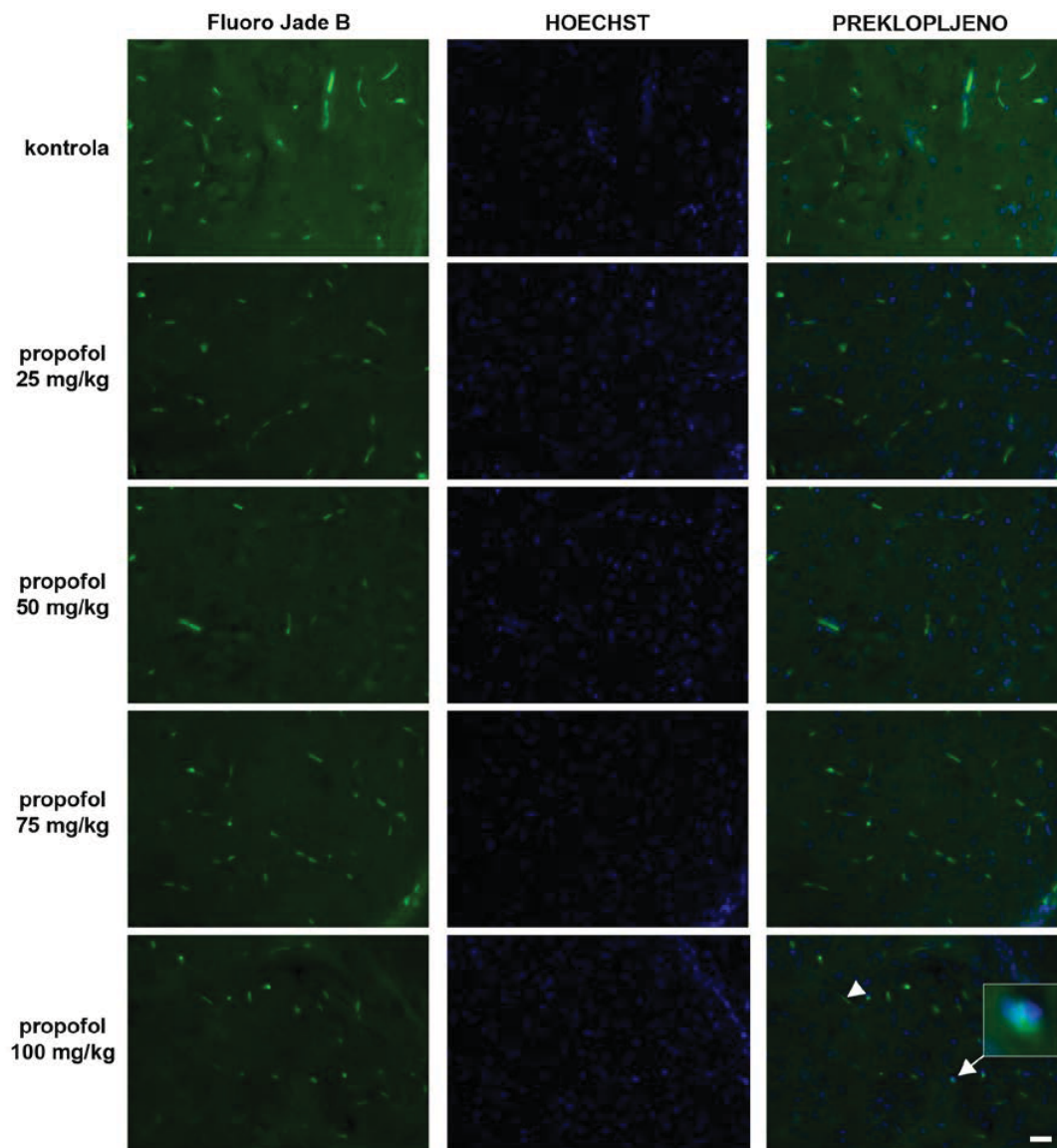


Slika 34. **Propofolski tretman nije indukovao neurodegeneraciju u kori i talamusu PND14 pacova.** Fluoro-žad B bojenje (leva kolona), Hoechst 33258 bojenje (srednja kolona) i preklopljene slike (desna kolona) preseka reprezentativnih mozгова. U redovima su prikazani kora i talamus kontrolnih (prvi i treći red) i tretiranih (16 h) (drugi i četvrti red) životinja. Kao pozitivna kontrola su korišćeni PND7 pacovi tretirani dva puta sa (+) MK-801 (0,5 mg/kg, i.p.) u razmaku od 8 sati. Fluoro-žad B pozitivne ćelije su obeležene strelicama, dok su krvni sudovi obeleženi glavom strelice. Skala=20  $\mu\text{m}$ .





Slika 35. **Propofolski tretman nije indukovao neurodegeneraciju u kori PND14 pacova.** Fluoro-žad B bojenje (leva kolona), Hoechst 33258 bojenje (srednja kolona) i preklopljene slike (desna kolona) preseka reprezentativnih mozgova. U redovima je prikazana kora kontrolnih (prvi red) i tretiranih (16 h) (drugi, treći, četvrti i peti red) životinja koje su primile propofol u dozi 25, 50, 75 i 100 mg/kg. Fluoro-žad B pozitivne ćelije su obeležene strelicama, dok su krvni sudovi obeleženi glavom strelice. Skala=20  $\mu$ m.

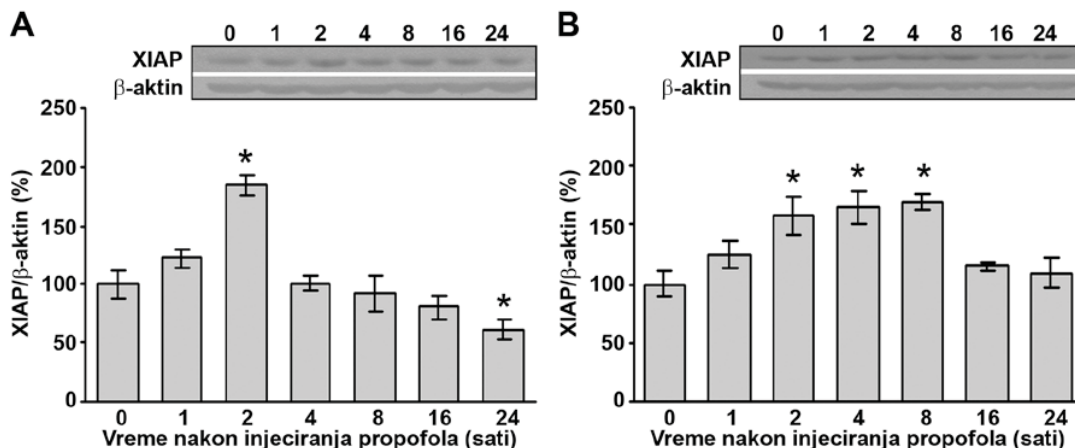


Slika 36. **Propofolski tretman nije indukovao neurodegeneraciju u talamusu PND14 pacova.** Fluoro-žad B bojenje (leva kolona), Hoechst 33258 bojenje (srednja kolona) i preklopljene slike (desna kolona) preseka reprezentativnih mozgova. U redovima je prikazana kora kontrolnih (prvi red) i tretiranih (16 h) (drugi, treći, četvrti i peti red) životinja koje su primile propofol u dozi 25, 50, 75 i 100 mg/kg. Fluoro-žad B pozitivne ćelije su obeležene strelicama, dok su krvni sudovi obeleženi glavom strelice. Skala=20  $\mu$ m.

### 4.3.6. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju XIAP proteina u kori i talamusu PND14 pacova

S obzirom da je u obe ispitivane strukture detektovan porast aktivnog fragmenta kaspaze-3 i da na histološkom nivou nisu detektovane neurodegenerativne ćelije, dalje smo hteli da istražimo da li je ovakva slika povezana sa promenama u ekspresiji XIAP proteina, koji se vezuje za aktivnu kaspazu-3 i inhibira njene egzekutorske funkcije. U kori ekspresija XIAP proteina (55 kDa) je jednaka kontrolnoj vrednosti osim u 2. satu nakon tretmana kada je detektovan prolazni dvostruki porast. Međutim, u 24. satu nakon tretmana detektovan je statistički značajan pad u ekspresiji XIAP proteina (~40% u odnosu na kontrolnu vrednost) (slika 37A, \* $p < 0,05$ ). U talamusu je propofolski tretman indukovao porast u ekspresiji XIAP proteina u periodu 2-8 sati (~75%). U ostalim ispitivanim vremenskim tačkama ekspresija XIAP proteina bila je jednaka kontrolnoj vrednosti (slika 37B, \* $p < 0,05$ ).

Jednofaktorska ANOVA je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka u obe ispitivane strukture (kora:  $F(6, 28)=14,457$ ,  $p=0,001$ ; talamus:  $F(6, 21)=7,001$ ,  $p=0,001$ ).



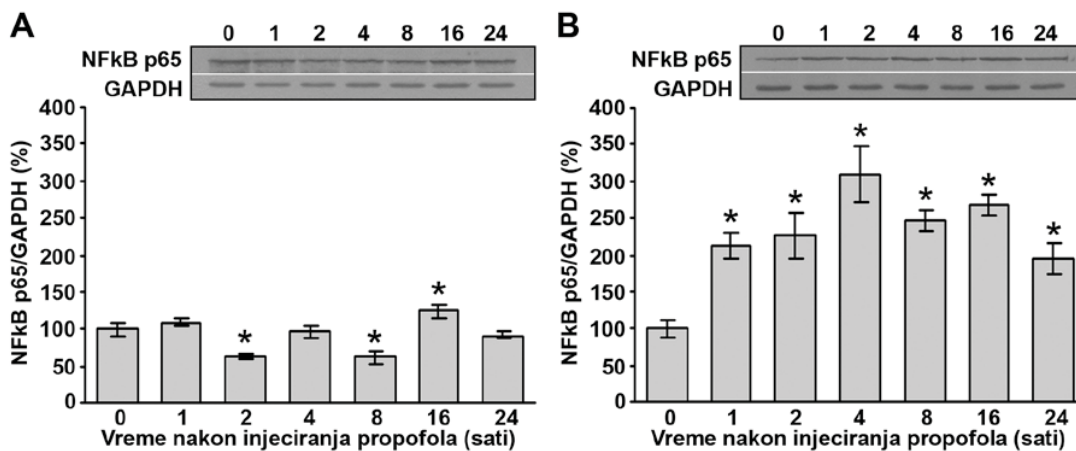
Slika 37. Propofolski tretman povećava ekspresiju XIAP proteina u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije XIAP proteina (55 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu β-aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti ± SEM ( $n = 5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

#### 4.3.7. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju NFκB p65 proteina u kori i talamusu PND14 pacova

U kori Western blot metodom su detektovani prolazni padovi u ekspresiji NFκB p65 proteina (65 kDa) u 2. i 8. satu (~40% u odnosu na kontrolnu vrednost), dok je jedini porast detektovan u 16. satu nakon tretmana (~35%) (slika 38A, \* $p < 0,05$ ).

Za razliku od kore, propofolski tretman je povećao ekspresiju NFκB p65 proteina u talamusu u svim ispitivanim vremenskim tačkama (2-3 puta u odnosu na kontrolnu vrednost) (slika 38B, \* $p < 0,05$ ).

Statistička analiza (jednofaktorska ANOVA) je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka u obe ispitivane strukture (kora:  $F(6, 35)=11,528$ ,  $p=0,001$ ; talamus:  $F(6, 21)=8,373$ ,  $p=0,001$ ).



Slika 38. Propofolski tretman različito utiče na ekspresiju NFκB p65 proteina u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije NFκB p65 proteina (65 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu GAPDH. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti  $\pm$  SEM ( $n=5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

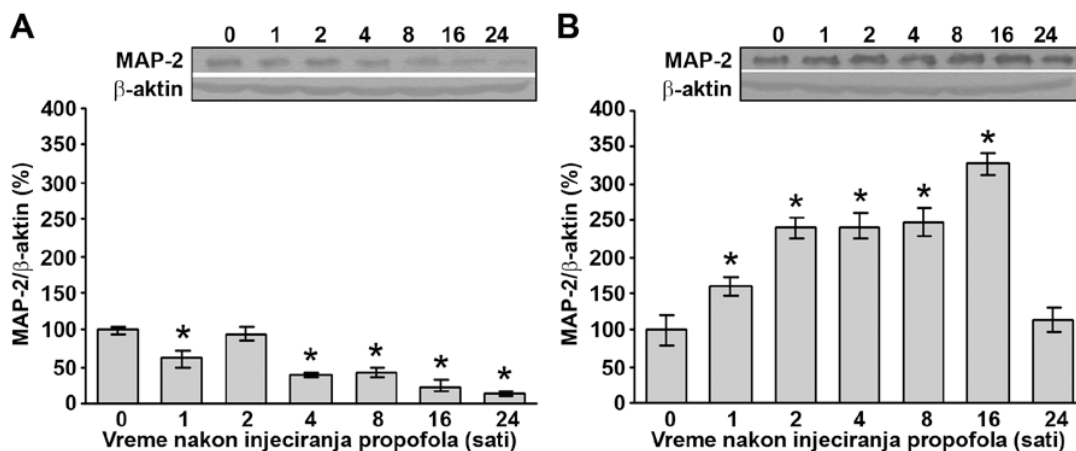
#### **4.4. Uticaj propofolskog tretmana na markere plastičnosti neuronalnih ćelija u kori i talamusu PND14 pacova**

##### **4.4.1. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju MAP-2 proteina u kori i talamusu PND14 pacova**

Treća celina ove disertacije se odnosi na ispitivanje uticaja propofolskog tretmana na ekspresiju markera plastičnosti nervnih ćelija. Nakon propofolskog tretmana Western blot metodom detektovan je statistički značajan pad u ekspresiji MAP-2 proteina (230 kDa) u kori (slika 39A), dok je statistički značajan porast detektovan u talamusu (slika 39B) PND14 pacova. Pad u ekspresiji MAP-2 proteina u kori je detektovan već u 1. satu nakon propofolskog tretmana (~35% u poređenju sa kontrolnom vrednošću). U 2. satu je detektovan prolazni porast u odnosu na prethodnu vremensku tačku, u kojoj je ekspresija MAP-2 proteina bila jednaka kontrolnoj vrednosti. Nakon toga je ekspresija MAP-2 proteina opadala sve do 24. sata, kada je zabeležen najveći pad (~90% u poređenju sa kontrolnom vrednošću) (slika 39A, \* $p < 0,05$ ).

U talamusu ekspresija MAP-2 proteina je imala suprotan profil u odnosu na koru. Porast u ekspresiji MAP-2 proteina detektovan je već u 1. satu nakon tretmana (~60% u poređenju sa kontrolnom vrednošću). Znatno veći porasti u ekspresiji MAP-2 proteina (2,5-3,5 puta) su detektovani u periodu 2.-16. sati nakon tretmana. Nakon tog perioda, u 24. satu je ekspresija MAP-2 proteina bila jednaka kontrolnoj vrednosti (slika 39B, \* $p < 0,05$ ).

Jednofaktorska ANOVA je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka (u kori:  $F(6, 49)=25,044$ ,  $p=0,001$  i u talamusu:  $F(6, 28)=23,251$ ,  $p=0,001$ ).



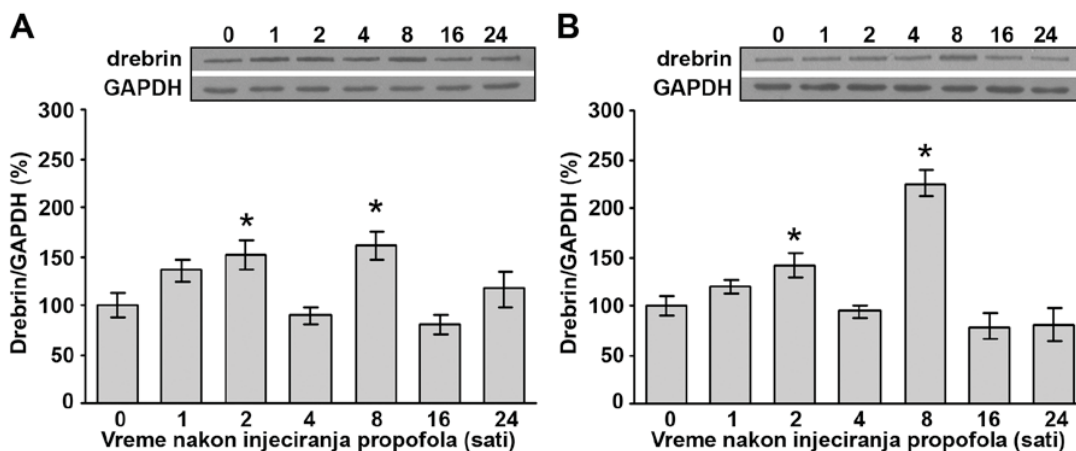
Slika 39. Propofolski tretman različito utiče na ekspresiju MAP-2 proteina u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije MAP-2 proteina (230 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu β-aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti ± SEM ( $n=5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

#### 4.4.2. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju drebrina u kori i talamusu PND14 pacova

U kori Western blot metodom je pokazano da propofolski tretman nije uticao na ekspresiju drebrina (120 kDa) osim u 2. i 8., kada je detektovan porast (~50-70% u odnosu na kontrolnu vrednost) (slika 40A, \* $p < 0,05$ ).

U talamusu, ekspresija drebrina ima sličan profil kao u kori. Porast u ekspresiji drebrina je detektovan u 2. satu (~45%), dok je maksimalni porast zabeležen u 8. satu nakon tretmana (više od 2 puta). U ostalim ispitivanim vremenskim tačkama ekspresija drebrina je jednaka kontroli (slika 40B, \* $p < 0,05$ ).

Jednofaktorska ANOVA je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka u obe ispitivane strukture (kora:  $F(6, 49)=5,589$ ,  $p=0,001$ ; talamus:  $F(6, 42)=17,710$ ,  $p=0,001$ ).



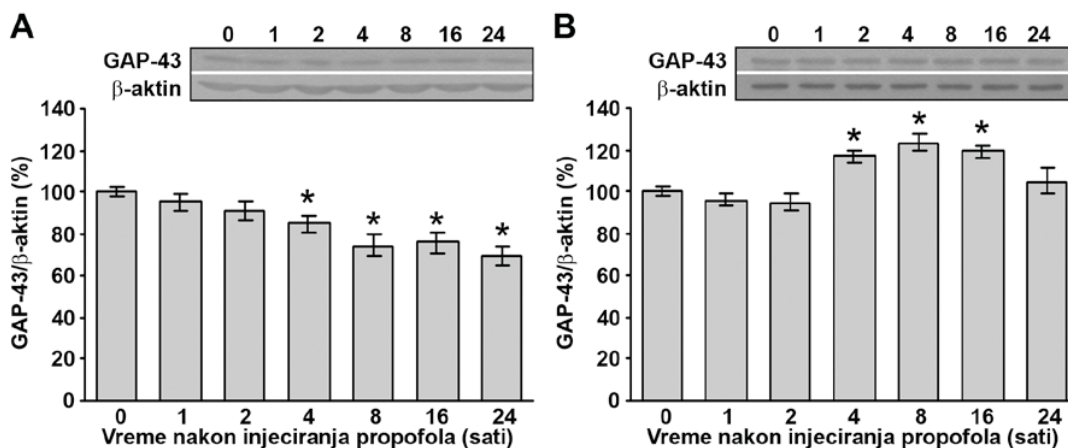
Slika 40. Propofolski tretman povećava ekspresiju drebrina u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije drebrina (120 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu GAPDH. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti  $\pm$  SEM ( $n=5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

#### 4.4.3. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju GAP-43 proteina u kori i talamusu PND14 pacova

Nakon propofolskog tretmana Western blot metodom detektovan je statistički značajan pad u ekspresiji GAP-43 proteina (43 kDa) u kori (slika 41A), dok je statistički značajan porast detektovan u talamusu (slika 41B) PND14 pacova. U kori Western blot metodom je pokazano da propofolski tretman nije uticao na ekspresiju GAP-43 proteina do 4. sata. Nakon toga ekspresija GAP-43 proteina je opadala sve do 24. sata, kada je zabeležen najveći pad (~35% u poređenju sa kontrolnom vrednošću) (slika 41A, \* $p < 0,05$ ).

Za razliku od kore, propofolski tretman je povećao ekspresiju GAP-43 proteina u talamusu samo u periodu 4-16 sati (~25% u poređenju sa kontrolnom vrednošću) (slika 41B, \* $p < 0,05$ ).

Jednofaktorska ANOVA je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka u obe ispitivane strukture (kora:  $F(6, 35)=8,056$ ,  $p=0,001$ ; talamus:  $F(6, 28)=12,399$ ,  $p=0,001$ ).



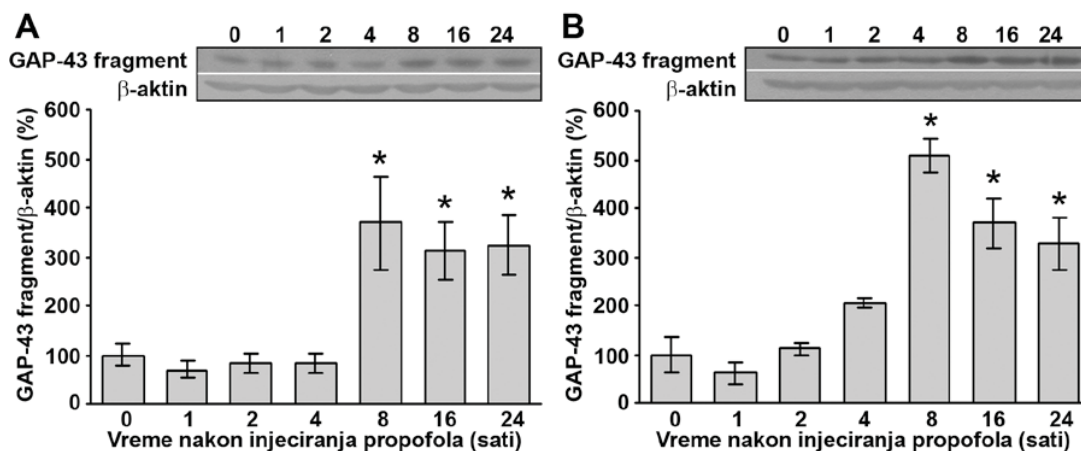
Slika 41. Propofolski tretman povećava ekspresiju GAP-43 proteina u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije GAP-43 proteina (43 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu β-aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti ± SEM ( $n=5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

Pored GAP-43 proteina, ispratili smo i uticaj propofolskog tretmana na zastupljenost fragmenata GAP-43 proteina. U kori Western blot metodom nisu detektovane statistički značajne promene u ekspresiji GAP-43 fragmenata (~40 kDa) sve do 8 sati nakon tretmana, kada je zapažen statistički značajan četverostruki porast. U 16. i 24. satu su detektovani trostruki porasti u ekspresiji GAP-43 fragmenata (slika 42A, \* $p < 0,05$ ).

U talamusu, ekspresija GAP-43 fragmenata ima gotovo identičan profil kao u kori, sa tim da je stepen promene u talamusu intenzivniji. Do 8. sata nakon tretmana nisu detektovane promene u ekspresiji GAP-43 fragmenata, a u periodu 8-24 sata ekspresija GAP-43 fragmenata je porasla 3-5 puta u odnosu na kontrolnu vrednost (slika 42B, \* $p < 0,05$ ).

Jednofaktorska ANOVA je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka u obe ispitivane strukture (kora:  $F(6, 28)=8,814$ ,  $p=0,001$ ; talamus:  $F(6, 21)=21,815$ ,  $p=0,001$ ).





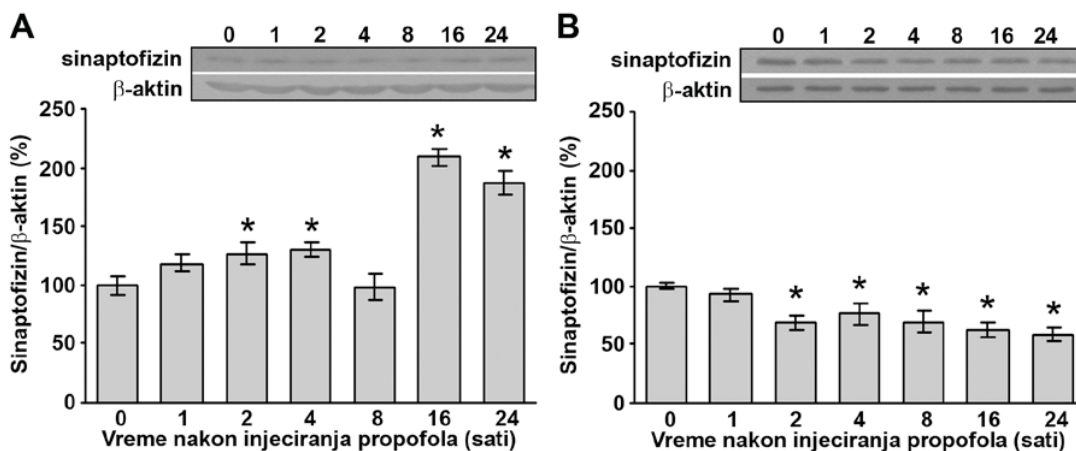
Slika 42. Propofolski tretman povećava ekspresiju GAP-43 fragmenata u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije fragmenata GAP-43 proteina (~40 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu β-aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti ± SEM ( $n=5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

#### 4.4.4. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju sinaptofizina u kori i talamusu PND14 pacova

Nakon propofolskog tretmana Western blot metodom detektovan je statistički značajan porast u ekspresiji sinaptofizina (38 kDa) u kori (slika 43A), dok je statistički značajan pad detektovan u talamusu (slika 43B) PND14 pacova. U kori je pokazano da propofolski tretman nije uticao na ekspresiju sinaptofizina do 2. sata, nakon čega je detektovan porast u periodu 2-4 sata nakon tretmana (~35%). U 8. satu je zabeleženo prolazno vraćanje ekspresije sinaptofizina na kontrolnu vrednost, a u periodu 16-24 sata nakon tretmana detektovan je dvostruki porast (slika 43A, \* $p < 0,05$ ).

Za razliku od kore, propofolski tretman je smanjio ekspresiju sinaptofizina u talamusu u periodu 2-24 sata nakon tretmana (20-40% u poređenju sa kontrolnom vrednošću) (slika 43B, \* $p < 0,05$ ).

Jednofaktorska ANOVA je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka u obe ispitivane strukture (kora:  $F(6, 49)=24,378$ ,  $p=0,001$ ; talamus:  $F(6, 28)=4,501$ ,  $p=0,003$ ).



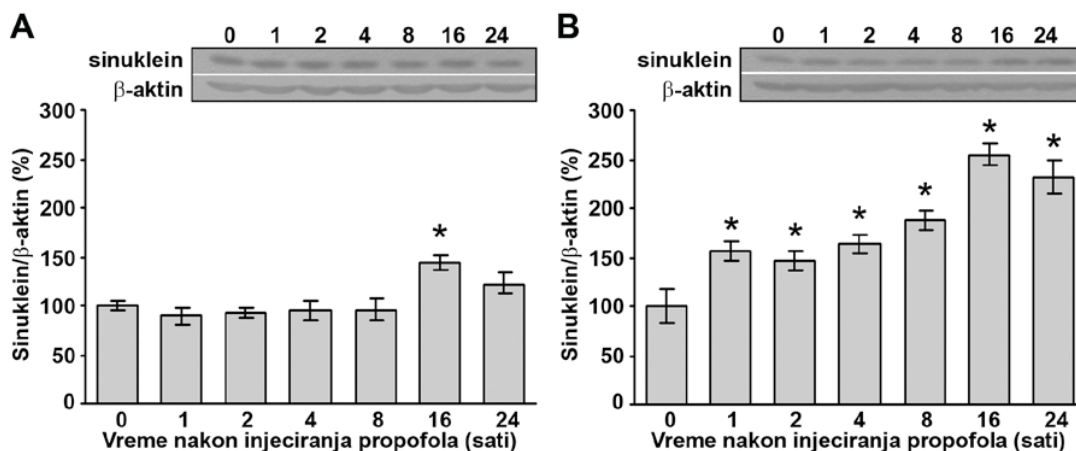
Slika 43. Propofolski tretman različito utiče na ekspresiju sinaptofizina u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije sinaptofizina (38 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu  $\beta$ -aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti  $\pm$  SEM ( $n=5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

#### 4.4.5. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju sinukleina-1 u kori i talamusu PND14 pacova

U kori Western blot metodom je pokazano da propofolski tretman nije uticao na ekspresiju sinukleina-1 (19 kDa) osim u 16. satu, kada je detektovan prolazni porast (~50% u odnosu na kontrolnu vrednost) (slika 44A, \* $p < 0,05$ ).

U talamusu je porast u ekspresiji sinukleina-1 detektovan već od 2. sata (~60%) i ovaj trend se održao do kraja ispitivanog vremenskog intervala. Maksimalni porast je zabeležen u 16. satu nakon tretmana (2,5 puta) (slika 44B, \* $p < 0,05$ ).

Jednofaktorska ANOVA je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka u obe ispitivane strukture (kora:  $F(6, 35)=5,296$ ,  $p=0,001$ ; talamus:  $F(6, 28)=18,362$ ,  $p=0,001$ ).



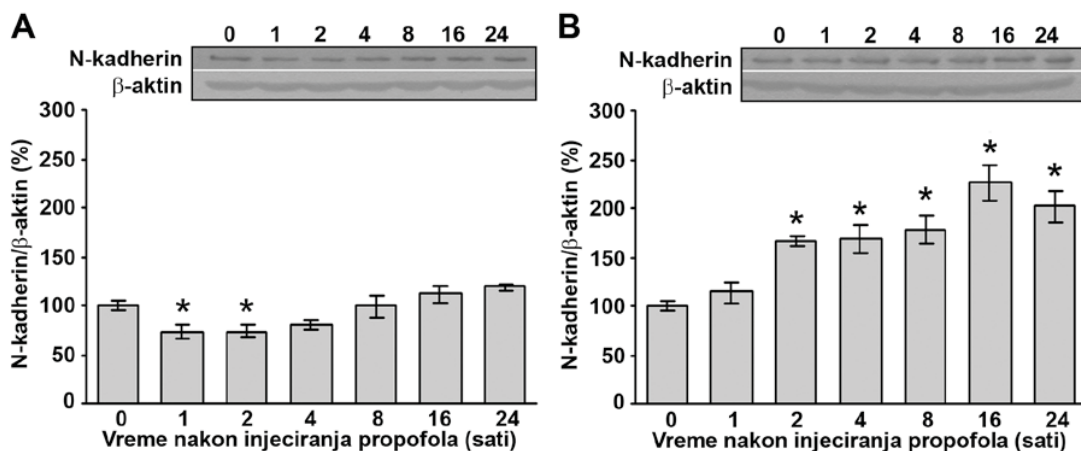
Slika 44. **Propofolski tretman povećava ekspresiju sinukleina-1 u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova.** Nivo ekspresije sinukleina-1 (19 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu β-aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti ± SEM ( $n=5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

#### 4.4.6. Uticaj propofolskog tretmana na ekspresiju N-kadherina u kori i talamusu PND14 pacova

Nakon propofolskog tretmana Western blot metodom detektovan je statistički značajan pad u ekspresiji N-kadherina (135 kDa) u kori (slika 45A), dok je statistički značajan porast detektovan u talamusu (slika 45B) PND14 pacova. U kori propofolski tretman je indukovao prolazni pad u ekspresiji N-kadherina u 1. i 2. satu (~25% u odnosu na kontrolnu vrednost). Nakon toga, u periodu 4-24 sata nakon tretmana ekspresija N-kadherina je bila jednaka kontrolnom nivou (slika 45A, \* $p < 0,05$ ).

U talamusu je zabeležen porast u ekspresiji N-kadherina u svim ispitivanim vremenskim tačkama osim u 1. satu nakon tretmana (75-125% u odnosu na kontrolnu vrednost) (slika 45B, \* $p < 0,05$ ).

Jednofaktorska ANOVA je pokazala da je vreme nakon tretmana značajan faktor za analizu podataka u obe ispitivane strukture (kora:  $F(6, 42)=6,379$ ,  $p=0,001$ ; talamus:  $F(6, 35)=11,762$ ,  $p=0,001$ ).



Slika 45. Propofolski tretman različito utiče na ekspresiju N-kadherina u kori (A) i talamusu (B) PND14 pacova. Nivo ekspresije N-kadherina (135 kDa) praćen je Western blot metodom u uzorcima kore i talamusa izolovanim 1, 2, 4, 8, 16 i 24 sata nakon tretmana propofolom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu β-aktina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost relativne zastupljenosti ± SEM ( $n=5$ ) u odnosu na optičku gustinu trake kontrolnog uzorka (0 sati), koja je arbitrarno određena kao 100 %. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. Oznaka značajnosti na slici: \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

## **5. DISKUSIJA**

### **5.1. Dozno- i starosno-zavisni efekti propofola**

Izbor adekvatne doze propofola je bio jedan od ključnih događaja ne samo za izradu ove teze već i za projekat u okviru koga je teza urađena. Naime, kada smo započinjali sa realizacijom eksperimenata (2007) nije bilo podataka o dozno- ili starosno-zavisnim efektima propofola, te smo o izboru doze morali da odlučimo na osnovu sopstvenih zapažanja. Izabrana je doza propofola 25 mg/kg, jer je bez bojazni od cijanoze i zastoja u disanju mogla da se primeni kako kod PND7 tako i kod PND14 pacova, što je bilo od značaja za potrebe projekta. Pri izboru doze nismo koristili analize krvi za precizno utvrđivanje hipoksije, jer kod malih životinja to predstavlja invazivnu proceduru s obzirom na veliki broj uzoraka (3-5) koje bi trebalo imati za period u kome je životinja u stanju anestezije (oko 20 min). Međutim, istraživanja u kojima je korišćena čak i nešto veća doza propofola (30 mg/kg) kod mlađih eksperimentalnih životinja (PND6) nisu pokazala bilo kakve razlike u parametrima dobijenim iz krvi kontrolnih i tretiranih životinja, čak i kada je propofol primenjivan kumulativno (30 mg/kg svakih 90 min do kumulativne doze od 90 mg/kg; Bercker i saradnici, 2009). Takođe treba istaći da ima studija u kojima su mlade jedinke miševa tretirane veoma visokom dozom propofola (više od 100 mg/kg; Cattano i saradnici, 2008). Rezultati dobijeni u našoj studiji su ukazali da je sa starošću eksperimentalne životinje potrebno povećavati dozu propofola u cilju indukcije anestezije, što je u saglasnosti sa podacima iz literature koji govore da je anestetska doza propofola kod adultnih pacova 100 mg/kg.

### **5.2. Uticaj propofolskog tretmana na signalni put neurotrofina u kori i talamusu PND14 pacova**

#### **5.2.1. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji BDNF iRNK i proteina u kori i talamusu PND14 pacova**

BDNF je široko rasprostranjeni neurotrofin u CNS-u sisara (Huang i Reichardt, 2001). Kako u adultnom mozgu tako i u mozgu tokom razvića ima brojne uloge kao što

su rast, preživljavanje, diferencijacija i sinaptička plastičnost postmitotskih neurona. U ovom istraživanju je pokazano da jednokratni tretman PND14 pacova anestetskom dozom (25 mg/kg) propofola značajno utiče na ekspresiju BDNF-a kako na nivou iRNK, tako i na nivou proteina. Ove promene su se pokazale kao region-specifične i dinamički su modulirane tokom prvih 24 sata nakon jednokratnog propofolskog tretmana. Naime, naši eksperimenti su pokazali da je nakon tretmana ekspresija iRNK za BDNF povećana u kori, a smanjena u talamusu PND14 pacova. Poznato je da brojni stimuli utiču na ekspresiju BDNF gena kako u fiziološkim, tako i u patološkim uslovima (Lindholm i saradnici, 1994). Na primer, svetlosna stimulacija povećava ekspresiju iRNK za BDNF u vizuelnoj kori (Castren i saradnici, 1992), osmotska stimulacija povećava ekspresiju iRNK za BDNF u hipotalamusu (Castren i saradnici, 1995; Dias i saradnici, 2003), dok stimulacija brkova kod pacova povećava ekspresiju iRNK za BDNF u somatosenzornoj kori (Rocamora i saradnici, 1996). S obzirom da je transkripcija BDNF gena zavisna od aktivnosti neurona (Zafra i saradnici, 1991; Aid i saradnici, 2007) naši rezultati indirektno ukazuju da tretman propofolom na region-specifičan način utiče na aktivnost neurona u periodu nakon tretmana. Međutim, za ovakvu tvrdnju su potrebna dodatna istraživanja u kojima bi se ispitala promene u ekspresiji drugih dobro poznatih gena čija transkripcija takođe zavisi od aktivnosti neurona, među kojima je na prvom mestu c-Fos.

U našoj studiji propofolski tretman je doveo do značajnog pada u ekspresiji proBDNF proteina, dok u talamusu nisu detektovane bilo kakve promene. Poznato je da nivoi BDNF transkripata mogu da budu u negativnoj korelaciji sa proBDNF proteinom. U studiji Macias i saradnici (2007), ćelije motornih jedara ventralnih rogova kičmene moždine su imale intenzivan BDNF iRNK signal, dok proBDNF nije detektovan. Ova grupa je postavila hipotezu po kojoj je proBDNF u ovim ćelijama sintetisan pretežno na nervnim završecima i brzo preveden u zrelu formu ili je sintetisan u somi i brzo transportovan do nervnog završetka. Negativna korelacija BDNF transkripata i proteina je pokazana i u mnogim drugim studijama (Jacobsen i Mork, 2004; Musazzi i saradnici, 2009). Jedan od potencijalnih problema u radu je upotreba nespecifičnih primarnih antitela. U ovoj studiji je korišćeno proBDNF antitelo (AB5613P, Chemicon International Inc.) koje je iz drugih studija isključeno zbog nereproducibilnih rezultata (Macias i saradnici, 2007). U cilju detektovanja proBDNF proteina, membrane su

tretirane sa antitelom koje prepoznaje i zreli BDNF (N-20, Santa Cruz). Interesantno, upotrebom ovog antitela detektovano je nekoliko jakih imunoreaktivnih traka, ali ne i traka od 32 kDa. Karakterizacija ovih traka je veoma dobro opisana u studiji Macias i saradnika (2007).

Suprotan trend u odnosu na iRNK je detektovan i u ekspresiji zrelog BDNF proteina. Snažan porast u ekspresiji zrelog BDNF proteina u talamusu PND14 pacova koji je indukovano propofolskim tretmanom je u suprotnosti sa rezultatom kod PND7 pacova, kod kojih je isti propofolski tretman doveo do pada u ekspresiji zrelog BDNF proteina (Pešić i saradnici, rad u pripremi) ili upotrebom anestetskog koktela koji sadrži midazolam, izofluran i azot oksid (Lu i saradnici, 2006). Porast u ekspresiji BDNF proteina kod PND14, ali ne i PND7 pacova može se objasniti retrogradnim transportom zrelog BDNF-a (Curtis i saradnici, 1995). Poznato je da se BDNF može transportovati i anterogradno u CNS-u i na taj način deluje i kao neurotrofinski faktor koji je indukovano aktivnošću i kao autokrini/parakrini modulator (Altar i DiStefano, 1998). Pokazano je da inhibicija aksonalnog transporta poništava ekspresiju BDNF proteina lokalizovanog u nervnim završetcima (Conner i saradnici, 1997; Altar i saradnici, 1997; Altar i DiStefano, 1998). Postoje brojni podaci vezani za regulisani unutarćelijski transport BDNF i Trk receptora; pokazano je da intaktni neurotrofin-Trk kompleks može retrogradno da se transportuje do ćelijskih tela (Miller i Kaplan, 2001; Ginty i Segal, 2002). Za razliku od talamusa, nivoi zrelog BDNF proteina u kori su se smanjili u odnosu na kontrolnu vrednost tokom ispitivanog vremenskog perioda. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa drugim glodarskim studijama u kojima je propofol doveo do smanjenja BDNF-a u parijetalnoj kori (Ponten i saradnici, 2011).

Zanimljivo je da je BDNF protein otkriven i u nekim neuronima u kojima nije detektovana iRNK za BDNF i koji nisu sposobni da sintetišu neurotrofine (Conner i saradnici, 1997). Ovo ukazuje da vanćelijski BDNF može biti preuzet od strane pre- ili post-sinaptičkih neurona, kao što je pokazano u kulturi kortikalnih neurona transfektovanih sa GFP-obeležanim BDNF-om (Kohara i saradnici, 2001). I u *in vivo* studijama je pokazan trans-neuronalni transport BDNF-a nakon injekcije BDNF-a u oko embriona pileta (von Bartheld i saradnici, 1996; Butowt i von Bartheld, 2001) ili u adultnim pacovima (Caleo i saradnici, 2000; Caleo i saradnici, 2003; Butowt i von Bartheld, 2005). Pored transporta ka distalnim sinapsama, BDNF može i lokalno da se

reciklira. U hipokampusu, kompleks BDNF-TrkB se internalizuje Pincher (*engl.* pinocytic chaperone)- posredovanom makroendocitozom u aksonima i dendritima i brzo ulazi u lokalne puteve reciklaže koji su nezavisni od ER i Goldži kompleksa (Valdez i saradnici, 2005). Internalizovani BDNF može se osloboditi stimulacijom neurona, čime se omogućava recikliranje neurotrofina, a pokazano je da taj reciklirani BDNF doprinosi održavanju LTP-a (Santi i saradnici, 2006).

Poznato je da je sekrecija BDNF-a zavisna od oslobađanja  $Ca^{2+}$  iz unutarćelijskih depoa (Tao i saradnici, 1998; Hartmann i saradnici, 2001; Blum i Konnerth, 2005). Prekomerna ekspresija BDNF proteina (10-20 puta) je pokazana u hipokampalim neuronima i pokazano je da je ovo oslobađanje nezavisno od vanćelijskog  $Ca^{2+}$ , ali da zavisi od oslobađanja  $Ca^{2+}$  iz unutarćelijskih depoa (Gartner i Staiger, 2002). S obzirom da propofol utiče na homeostazu  $Ca^{2+}$  (Jensen i saradnici, 1994), moguće je da su nastale razlike u ekspresiji zrelog BDNF-a u dve ispitivane strukture posledica različite osetljivosti na propofolom-indukovan  $Ca^{2+}$  fluks. Sa druge strane oslobađanje  $Ca^{2+}$  iz unutarćelijskih depoa putem IP3 sinteze i/ili indirektna modulacija ulaska  $Ca^{2+}$  u ćeliju i putem voltažno-zavisnih  $Ca^{2+}$  kanala ili NMDA receptora, može direktno biti povećano signalnom kaskadom koju indukuju BDNF i TrkB receptor (Segal i Greenberg, 1996). Pomenute studije ukazuju na jednostavan model povratne sprege (Lo, 1995) koji se može primeniti i na našem modelu.

Sveukupno, ovi rezultati ukazuju na brzi promet BDNF-a koji se odnosi na njegovu redistribuciju iz kore ka drugim strukturama i iz drugih struktura ka talamusu. Možemo pretpostaviti da tretman propofolom brzo reguliše BDNF na posttranslacionom nivou, međutim ovaj proces treba dublje istražiti, naročito što u ovom istraživanju nisu ispraćeni enzimi koji obrađuju pro forme neurotrofina do zrelih.

### **5.2.2. Propofolski tretman utiče na ekspresiju ukupnog i fosforilisanog TrkB receptora u kori i talamusu PND14 pacova**

Propofolom-indukovani pad u ekspresiji zrelog BDNF proteina u kori (detektovan u periodu 8-24 sata nakon tretmana) je praćen padom u ekspresiji fosforilisanog TrkB receptora. Mada u ovom radu nije detaljno praćeno da li su promene u količini BDNF-a unutarćelijske ili vanćelijske ovakvi rezultati ukazuju da su



promene u ekspresiji BDNF-a indukovane propofolskim tretmanom najverovatnije vanćelijske, usled čega je i detektovana odgovarajuća modulacija aktivnosti (fosforilacije) TrkB receptora. Sa druge strane, detektovani porast u ekspresiji zrelog BDNF-a u svim ispitivanim vremenskim tačkama u talamusu je praćen porastom u ekspresiji pTrkB receptora samo u periodu 1-4 sata nakon tretmana. Ovakvi rezultati ukazuju da povećana ekspresija BDNF liganda nije merilo aktivnosti TrkB receptora, jer nakon određenog vremenskog perioda dolazi do izražaja fenomen desenzitizacije. Ovakav odgovor sistema je verovatno deo protektivnog mehanizma koji štiti isti od potencijalnih posledica preterane aktivnosti Trk receptora. U *in vitro* eksperimentima je pokazano da se pTrk receptor akumulira u ćelijskim telima i proksimalnim aksonima simpatičkih i senzornih neurona nakon izlaganja neurotrofinima (Riccio i saradnici, 1997; Tsui-Pierchala i Ginty, 1999; Watson i saradnici, 1999).

Pored fosforilisanog TrkB receptora, ispraćena je i ekspresija ukupnog TrkB receptora. Pad u ekspresiji ukupnog TrkB receptora u kori je detektovan u periodu 8-16 sati nakon tretmana, dok je u talamusu smanjena ekspresija detektovana samo u 8 satu nakon tretmana. U skladu sa dobijenim podacima vezanim za ekspresiju zrelog BDNF proteina i TrkB receptora (ukupnog i fosforilisanog), može se postaviti hipoteza da blagi porast u nivou BDNF-a uglavnom pokreće brze promene u količini TrkB receptora, dok veliki porast BDNF nivoa uglavnom utiče na aktivnost TrkB receptora, a ne njihovu količinu. Pored toga, smatramo da rezultati dobijeni za talamus jasno ukazuju na to kako se sistem brani od prevelike količine liganda i dugotrajne receptorske aktivnosti. Ovo je očekivano s obzirom na važne uloge koje BDNF ima tokom ranog postnatalnog razvika.

Pored ukupnog i fosforilisanog TrkB receptora, ispratili smo i ekspresiju jezgra pTrkB receptora. Jezgro Trk receptora predstavljaju fosforilisane, ali ne i glikozilovane forme koje nisu eksprimirane na površini ćelije i koje imaju nižu molekulsku težinu (80 kDa) u odnosu na receptor eksprimiran na površini ćelije (140 kDa) (Watson i saradnici, 1998). Treba naglasiti da je ovaj protein detektovan samo u kori PND14 pacova. U skladu sa rezultatima za ukupni i pTrkB, možemo predpostaviti da u kori dolazi i do deglikozilacije ovog receptora, što nije slučaj sa talamusom. Međutim, do danas ne postoje podaci o uticaju opštih anestetika na glikozilaciju Trk receptora.

Primarni transkripti za TrkB i TrkC podležu alternativnom iskrajanju u kome se tirozin kinazni domen zamenjuje kratkim unutarćelijskim domenom, tako da pored celog

(*full length*) TrkB receptora, u centralnom nervnom sistemu je zastupljena i skraćena forma ovog receptora (*truncated*) (Barbacid, 1994). Ovi skraćeni TrkB receptori, trkB-T1 i trkB-T2, poseduju receptorski domen TrkB<sup>FL</sup> ali nemaju unutarćelijski kinazni domen. Skraćene TrkB i TrkC izoforme mogu da deluju kao endogeni inhibitori signalizacije koju pokreću Trk receptori sa tirozin kinaznim domenima (Eide i saradnici, 1996). Međutim, skraćene izoforme mogu da direktno posreduju u neurotrofinskoj signalizaciji. BDNF koji se vezuje za skraćenu TrkB-T1 izoformu i u kompleksu sa p75 receptorom reguliše formiranje dendritskih filopodija u hipokampalnim neuronima (Hartmann i saradnici, 2004). Rose i saradnici (2003) su pokazali da skraćeni TrkB receptori mogu da indukuju unutarćelijsku signalizaciju i da posreduju u brzim neurotrofin-indukovanim Ca<sup>2+</sup> talasima u glijalnim ćelijama. Ovi Ca<sup>2+</sup> signali indukovani BDNF-om odražavaju PLC/IP<sub>3</sub>-zavisno oslobađanje Ca<sup>2+</sup> iz unutarćelijskih rezervoara, što je praćeno dodatnim influksom Ca<sup>2+</sup> otvaranjem Ca<sup>2+</sup> kanala (Rose i saradnici, 2003). S obzirom da su skraćeni TrkB receptori bez vezujućeg mesta za PLC- $\gamma$  i da je aktivacija BDNF-indukovane Ca<sup>2+</sup> signalizacije zavisna od G proteina (Rose i saradnici, 2003), smatra se da u glijalnim ćelijama u Ca<sup>2+</sup> signalizaciji učestvuje ne PLC- $\gamma$ , već jedna njegova izoforma. S obzirom na predominantnu ekspresiju TrkB-T1, ali ne i TrkB-T2, u gljalnim ćelijama, smatra se da je ova skraćena verzija TrkB receptora odgovorna za ove akutne neurotrofinske efekte. Poznato je da Ca<sup>2+</sup> signalizacija u glijalnim ćelijama moduliše neuronalnu aktivnost (Bezzi i Volterra, 2001), u vezi sa tim BDNF može imati ulogu medijatora između neurona i glije (Reichardt, 2003).

### **5.2.3. Propofolski tretman utiče na ekspresiju NGF iRNK i proteina u kori i talamusu PND14 pacova**

Pored BDNF-a, drugi ispitivani neurotrofin u ovoj studiji je NGF. Kao i BDNF, NGF se eksprimira u formi prepropeptida, koji se obrađuje do zrele forme. U ovom istraživanju, propofolski tretman je doveo do prolaznog pada u ekspresiji NGF iRNK u obe ispitivane strukture. Za razliku od toga, blagi porasti u ekspresiji proNGF proteina, kao i prolazni padovi u ekspresiji zrelog NGF-a su detektovani u obe ispitivane strukture. Neslaganje između profila iRNK i proteina se može objasniti na više načina:

usled različite osetljivosti korišćenih tehnika, vremenskog neslaganja između genske ekspresije i akumulacije proteina, kao i usled različitih post-translacionih modifikacija (Tria i saradnici, 1994; Sano i saradnici, 1996; Pandey i Mann, 2000). Neslaganje između nivoa iRNK i proteina ukazuje da je količina ispitivanih proteina određena post-transkripcionom regulacijom, a ne samo ekspresijom iRNK. Kada se iRNK i proteinski nivoi mere u istoj strukturi mozga neslaganje između dobijenih rezultata nije neobično jer promene u ekspresiji iRNK u jednoj strukturi mogu biti povezane sa promenama u zastupljenosti odgovarajućeg proteina u drugoj strukturi, što zavisi od lokalizacije ispitivanog proteina u neuronima. To bi značilo da promene u nivoima ispitivanog proteina u jednom regionu mogu nastati iz neuronskih projekcija ka tom regionu, a ne od neurona iz tog ispitivanog regiona.

Za proNGF se dugo smatralo da ima isključivo neurotoksične uloge, međutim postoje podaci da proNGF pored neurotoksičnih može imati i neurotrofičke efekte (Fahnestock i saradnici, 2004a). U studiji Bruno i Cuello (2006) je pokazan čitav spektar izoformi proNGF-a u kori. Trake od 30 kDa ili 32 kDa zajedno sa trakom od 40 kDa su detektovane ne samo u adultnom mozgu već i u perifernim tkivima (Bruno i Cuello, 2006; Quartu i saradnici, 2003; Lobos i saradnici, 2005; Bierl i Isaacson, 2007). Proteinske trake na višim težinama su takođe otkrivene, ali je njihova biološka uloga nepoznata. U najvećem broju ovih studija je korišćeno antitelo koje prepoznaje zreli NGF. Međutim, pokazano je da jedno od najčešće korišćenih antitela, H-20 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) koje je podignuto protiv sintetskog peptida iz humanog NGF-a u stvari unakrsno reaguje i sa NT-3 u četvorostruko većim koncentracijama nego sa NGF-om (Fahnestock i saradnici, 2001).

#### **5.2.4. Propofolski tretman povećava ekspresiju fosforilisanog TrkA receptora u kori i talamusu PND14 pacova**

Ekspresija drugog ispitivanog neurotrofina, zrelog NGF-a, je opala u obe ispitivane strukture nakon propofolskog tretmana. Sa druge strane detektovana je hiperfosforilacija njegovog odgovarajućeg receptora TrkA u obe ispitivane strukture. Ovakvi rezultati ukazuju da u našem eksperimentalnom modelu, promene u ekspresiji NGF-a nisu uticale na aktivnost TrkA receptora, kao što je pokazano u ranijim

studijama (Rajagopal i saradnici, 2004). Međutim, u *in vitro* studijama je pokazano da pored NGF-a, drugi ligandi (NT-3, adenzin i drugi molekuli koji su vezani za G proteine) mogu da fosforilišu TrkA receptor (Rajagopal i saradnici, 2004). Takođe, pokazano je da je moguća i auto-aktivacija ovog receptora u odsustvu NGF liganda (Hempstead i saradnici, 1992).

Pored zrelog fosforilisanog TrkA receptora (140 kDa) ispraćena je i ekspresija jezgra pTrkA receptora (80 kDa). Propofolski tretman je doveo do porasta u ekspresiji jezgra pTrkA u kori, dok je suprotan trend detektovan u talamusu. U studiji Watson i saradnika (1998) je pokazano da je zreli 140 kDa pTrkA receptor u okviru 24 sata od tretmana tunikamicinom (inhibitor glikozilacije) u potpunosti zamenjen jezgrom receptora (80 kDa). Kao i u našoj studiji, detektovano je i nekoliko intermedijernih traka koje najverovatnije predstavljaju delimično deglikozilovane izoforme pTrkA receptora. Iznenadujuće, jezgro proteina i neglikozilovane izoforme su fosforilisane na tirozinskom ostatku čak i u odsustvu NGF-a, što ukazuje na činjenicu da je receptor konstitutivno aktivan i u odsustvu glikozilacije (Watson i saradnici, 1998). Poznato je da N-glikozilacija reguliše obeležavanje mnogih transmembranskih glikoproteina od endoplazmatskog retikuluma pa sve do ćelijske površine. Imunobojenjem sa Trk antitelom je pokazano da je u PC12 ćelijama zreli TrkA receptor lokalizovan i unutar ćelije i na plazma membrani, nezavisno od prisustva NGF-a, dok je konstitutivno aktivno jezgro TrkA proteina lokalizovano samo unutar ćelije (Watson i saradnici, 1998). Dodavanjem NGF-a, zreli pTrkA je detektovan uglavnom na plazma membrani, a manji procenat je detektovan i unutar ćelije gde se javlja po određenoj šemi koja odgovara endocitotskim vezikulama (Grimes i saradnici, 1996). Međutim, iako je neglikozilovani pTrkA katalitički aktivan, on nije u stanju da indukuje aktivaciju nishodnih kinaza kao što su MEK1/2 i ERK1/2.

Zanimljivo je da su u kori detektovani porasti u ekspresiji jezgra i pTrkA i pTrkB, što nije slučaj sa talamusom, tako da možemo reći da propofol na regionalno-specifičan način utiče na deglikozilaciju i internalizaciji Trk receptora.

### **5.2.5. Propofolski tretman povećava ekspresiju p75 receptora u kori i talamusu PND14 pacova**

U ovom istraživanju, propofolski tretman je doveo do blagog porasta u ekspresiji p75 receptora u obe ispitivane strukture. p75 ima mnogobrojne uloge u nervnom sistemu; ovaj receptor može da indukuje izrastanje neurita i ćelijsko preživljavanje ili ćelijsku smrt u zavisnosti od toga da li deluje samostalno ili je ko-eksprimiran sa Trk receptorima.

Neurodegeneracija je u fokusu mnogobrojnih istraživanja, međutim postavlja se veliki broj pitanja koja se odnose na mehanizme koji određuju da li će neuron da preživi, umre ili će podleći funkcionalnom oštećenju. Bez sumnje, neurotrofini i njihovi receptori su ključni igrači u ovom fenomenu, ne samo tokom razvića, već i u adultnom mozgu (Arevalo i Wu, 2006). Dugo je poznato da Trk receptori posreduju u trofičkoj podršci adultnim neuronima, što je i pokazano u brojnim studijama u kojima je smanjena ekspresija ovih receptora povezana sa gubitkom ćelija. Interesantno je da iako je ekspresija p75 veoma niska u brojnim ćelijskim tipovima kod adulata, njegova ekspresija se snažno indukuje u povredi. Brojne studije su pokazale da je ova ekspresija indukovana povredom u bliskoj korelaciji sa degenerativnim efektima uočenim nakon povrede. Ekspresija p75 je povećana u motornim neuronima pacova nakon lezije sciatičkog nerva (Ernfors i saradnici, 1989), u hipokampusu nakon epileptičnih napada i u ovom slučaju je usko vezana za apoptozu (Roux i saradnici, 1999), a povezana je i sa neuronskom degeneracijom nakon eksperimentalno indukovane ishemijske (Greferath i saradnici, 2002). Rezultati pomenutih studija su u skladu sa hipotezom da povećana ekspresija p75, praćena padom u ekspresiji Trk receptora, pomera balans od ćelijskog preživljavanja ka ćelijskoj smrti.

Pokazano je da se neuroapoptoza indukovana anestezijom u najvećoj meri javlja vezivanjem proBDNF-a za p75 receptor (Head i saradnici, 2009), a zna se da je ekspresija ovog receptora razvojno-regulisana, u smislu da je visoka tokom perioda osetljivosti na anestezijom indukovanu neuroapoptozu, kao i da je niska u periodu kada mozak nije više toliko osetljiv na anesteziju (oko PND14) (Woo i saradnici, 2005; Yang i saradnici, 2009). Međutim, danas su poznate i uloge p75 receptora koje nisu vezane za pokretanje ćelijske smrti. TrkB/p75 heterokompleks je neophodan za selektivnost

BDNF-a, kao i za visoko afinitetno vezivanje (Teng i Hempstead, 2004). Poznato je da p75 receptor može da moduliše funkcije TrkA receptora u perifernim neuronima, kao i da može retrogradno da transportuje neurotrofine (Neet i Campenot, 2001). Takođe, p75 može da pomogne zadržavanju TrkA receptora na plazma membrani, tako što inhibira TrkA poliubikvitinaciju (Makkerh i saradnici, 2005). Međutim, postoje i kontradiktorni podaci koji ukazuju da koeksprimiran p75 ima važnu ulogu u TrkA ubikvitinaciji (Geetha i saradnici, 2005). Mehanistički, kooperacija između Trk i p75 receptora može biti veoma raznovrsna, tako da je moguće da u našem modelu p75 deluje kao koreceptor čije funkcije zavise od prostorne distribucije u mozgu.

Kao što je već pomenuto, signalizacija preko p75 receptora je povezana sa finalnom ishodom kako preživljavanja, tako i smrti. Moguće objašnjenje leži u aktivaciji različitih signalnih puteva nakon vezivanja liganada za p75 receptor. Upravo to je i pokazano, da kao i drugi članovi TNFR superfamilije, p75 može odvojenim signalnim putevima da aktivira c-JUN i NFκB. Karakterizacija puteva TNFR superfamilije van nervnog sistema je otkrila da aktivacija JNK tipično promovise ćelijsku smrt, i da je balansirana aktivacijom NFκB koja uglavnom promovise preživljavanje (Karin i Lin, 2002).

#### **5.2.6. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji ukupnih i fosforilisanih Akt kinaza u kori i talamusu PND14 pacova**

Akt je dobro okarakterisana serin/treonin kinaza koja deluje nishodno od neurotrofinskih receptora (Dolcet i saradnici, 1999). Vezivanje Shc za Trk receptore aktivira PI3K signalne puteve. Aktivacija PI3K dovodi do translokacije Akt-a do plazma membrane, gde se aktivira fosforilacijom od strane različitih kinaza uključujući fosfoinozimid-zavisne protein kinaze 1 i 2 (rictor–mTOR kompleksi) (Sarbasov i saradnici, 2005). Akt može da menja transkripcionu aktivnost različitih gena, ali može da indukuje i brze lokalne promene u proteomu regulacijom translacione mašinerije (Takei i saradnici, 2001; Takei i saradnici, 2004).

Jedna od najvažnijih uloga Akt-a je da spreči apoptozu inaktiviranjem pro-apoptotskih faktora ili stimulisanjem sinteze proteina koji favorizuju preživljavanje ćelija (Liao i Hung, 2010). U odgovoru na faktore rasta, Akt se fosforiliše na dva glavna

mesta (Thr308 i Ser473), pri čemu je fosforilacija na Thr308 neophodna, ali ne i dovoljna za maksimalnu aktivnost enzima, što se postiže samo ako je prisutna i fosforilacija na Ser 473 (Liao i Hung, 2010; Alessi i saradnici, 1996; Yang i saradnici, 2002). Do danas su se samo dve studije bavile ispitivanjem promena nivoa pAkt kinaze nakon anestezije kod mladih pacova (Pešić i saradnici, 2009; Lu i saradnici, 2006), međutim u ovim studijama nije ispraćen uticaj propofola na fosforilaciju obe pozicije Akt kinaze.

Nakon propofolskog tretmana u ovom istraživanju ekspresija pAkt Thr308 je smanjena u kori i povećana u talamusu. Ove promene grubo prate propofolom-indukovane trendove BDNF-a i pTrkB receptora. Iznenadujuće, promene u ekspresiji pAkt Ser473 su detektovane samo u kori, sa padom u istoj vremenskoj tački u kojoj je detektovan pad u ekspresiji pAkt Thr308. Zajedno sa podacima da tretman nije indukovao promene u ukupnim nivoima Akt kinaze u obe ispitivane strukture ovi rezultati jasno ukazuju da propofolski tretman utiče na kinaznu aktivnost Akt-a, a ne na njegovu količinu.

Ostaje da se dalje istraži zašto je u kori smanjena fosforilacija Thr308 praćena padom fosforilacije na poziciji Ser473, dok u talamusu povećana fosforilacija na Thr308 nije praćena istim modifikacijama na Ser473. Međutim, imajući u vidu da je Akt jedan od glavnih regulatora važnih ćelijskih funkcija, moguće je da ova delimična fosforilacija Akt kinaze služi da zaštiti sistem od hiperfosforilisane i previše aktivirane Akt kinaze, koja finalno može imati pogubne efekte (Nicholson i Anderson, 2002).

### **5.2.7. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji ukupnih i fosforilisanih ERK1/2 kinaza u kori i talamusu PND14 pacova**

Pored Akt-a, ERK kinaze su važne u procesima ćelijskog preživljavanja i deluju kao efektori signalnog puta neurotrofina (Grewal i saradnici, 1999). ERK1/2 anti-apoptotske efekte ispoljava ili smanjenjem aktivnosti pro-apoptotskih molekula ili smanjenjem njihove proteinske ekspresije putem transkripcione represije. Sa druge strane, ERK1/2 promoviše preživljavanje ćelija tako što stimuliše anti-apoptotske molekule. Aktivacija ove kinaze inhibira apoptozu u odgovoru na razne stimulse, kao što su TNF, FasL, TRAIL (*engl.* TNF-related apoptosis-inducing ligand) (Tran i

saradnici, 2001) i povlačenjem faktora rasta (Erhardt i saradnici, 1999). U odgovoru na ove stimulse ERK1/2 se aktivira ili prolazno ili dugotrajno i finalno ima anti-apoptotske efekte. Poznato je da inhibicija ERK1/2 promoviše apoptozu. Anti-apoptotski efekti ove kinaze mogu biti umanjeni nakon produžene stimulacije ili defosforilacijom ili degradacijom ERK-a (Lu i Xu, 2006). Mehanizmi kojima pERK1/2 inhibira apoptozu su kompleksni i razlikuju se u zavisnosti od tipa ćelija i tkiva.

Uticao propofola na fosforilaciju Erk kinaze je uglavnom ispitivana u *in vitro* studijama i dobijeni rezultati tih studija su kontradiktorni (Kozinn i saradnici, 2006; Oscarsson i saradnici, 2007; Kidambi i saradnici, 2010). U našoj studiji je pokazano da je ekspresija pERK1/2 povišena u kori i smanjena u talamusu PND14 pacova nakon propofolskog tretmana, dok se nivoi ukupnih ERK kinaza ne menjaju u ispitivanim strukturama. Povišena ekspresija pERK1/2 u kori se može javiti usled propofolom-indukovane aktivacije pTrkA receptora. Postoje podaci da je internalizacija TrkA receptora ključni događaj za održavanje ERK signalizaciju u PC12 ćelijama (Zhang i saradnici, 2000), kao i da je dugotrajna aktivacija MAPK aktivnosti specifična karakteristika neurotrofinske signalizacije (Qiu i Green, 1992). Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima novijih *in vitro* eksperimenata gde je pokazano da akutna aplikacija BDNF-a indukuje prolaznu MAPK signalizaciju, dok postepena aplikacija BDNF-a pokreće dugotrajnu, održavanu MAPK signalizaciju (Ji i saradnici, 2010). Pokazano je da dugotrajna kinazna aktivnost ne utiče isključivo na preživljavanje (Nguyen i saradnici, 1993; Boggio i saradnici, 2007). U odgovoru na stimulse, u većini neurona ERK može biti aktivan prolazno (manje od sat vremena), dok u drugim neuronima ERK ostaje dugotrajno aktivan (po nekoliko sati) i ova grupa neurona je imala veću dendritsku kompleksnost nego neuroni sa prolaznom ERK aktivnošću (Ha i Redmond, 2008). Treba napomenuti da postoje i podaci o supresiji ERK kinaze u kori od strane opštih anestetika (Planel i saradnici, 2007; Takamura i saradnici, 2008), međutim ove razlike se mogu javiti usled upotrebe anestetika različitih od propofola (pentobarbitol, izofluran), različite starosti ispitivanih životinja ili ispitivane kinetike koja u napomenutim studijama nije trajala duže od sat vremena.

Što se tiče smanjene ekspresije pERK1/2 kinaze u talamusu PND14 pacova nakon tretmana propofolom smatramo da su detektovane promene između ostalog i posledica propofolom-indukovane Akt signalizacije. Naime, u mnogim studijama je



pokazno da Akt inhibira ERK (Rommel i saradnici, 1999; Galetic i saradnici, 2003; Muller i Unterwald, 2004), međutim do danas ne postoje podaci o recipročnoj regulaciji Akt i ERK proteina od strane propofola *in vivo*. S obzirom da je poznato da inhibicija bilo ERK ili Akt kinaze povećava stepen apoptoze (Bonni i saradnici, 1999; Mabuchi i saradnici, 2002), pretpostavljamo da u našoj studiji regionalno-zavisna aktivacija ove dve kinaze može biti odgovorna za anti-apoptotske procese.

### **5.3. Uticaj propofolskog tretmana na markere inflamacije i apoptoze u kori i talamusu PND14 pacova**

Eksperimentalno je pokazano da anestezijom-indukovana neurodegeneracija zavisi od primenjene doze i vremena izlaganja određenom anestetiku, kao i da je ćelijska smrt neurona manje izražena nakon primene jednog anestetika, nego nakon primene nekoliko anestetika u kombinaciji (Loepke i Soriano, 2008). S obzirom da mehanizam anestezijom-indukovane neuronalne ćelijske smrti nije u potpunosti razjašnjen, ne zna se da li anestezija indukuje apoptozu ćelija koje inače ne bi ušle u ovaj program (patološka apoptoza), ili anestezija ubrzava apoptozu ćelija koje su inače predodređene da umru (rana fiziološka apoptoza). Ako se neuroni aktivno eliminišu tokom anestezije, neophodno je da se utvrdi da li je mozak tokom razvića sposoban da zameni ove neurone radi funkcionalnog integriteta. Odgovori na ova pitanja se mogu dobiti proučavanjem neurokognitivnih funkcija nakon neonatalne anestezije.

Animalne studije koje se bave proučavanjem efekata propofola na građu neurona i neurokognitivne performanse sugerišu da propofol na dozno-zavisan način povećava neurodegeneraciju, što vodi ka pogoršanjima u ponašanju i učenju (Fredriksson i saradnici, 2007; Jevtovic-Todorovic i saradnici, 2003). Iako neonatalno izlaganje propofolu u niskoj dozi (10 mg/kg) nije dovelo do neuroloških posledica, povećana neurodegeneracija i poremećaji u učenju kod adultnih miševa su uočeni nakon izlaganja neonatusa visokoj dozi propofola (60 mg/kg), ili kombinaciji propofola (10 mg/kg) i ketamina (25 mg/kg) (Fredriksson i saradnici, 2007). Visoke doze propofola su dovele i do promene u anksiolitičkim efektima diazepama kod adultnih životinja (Fredriksson i saradnici, 2007). Pored toga, korišćenjem *in vitro* preparata ćelijskih kultura neurona iz nezrelog mozga pileta ili pacova su pokazale dozno-zavisne strukturne promene

neurona nakon propofolskih tretmana (Vutskits i saradnici, 2005; Al-Jahdari i saradnici, 2006; Honegger i Matthieu, 1996; Spahr-Schopfer i saradnici, 2000).

### **5.3.1. Propofolski tretman povećava ekspresiju iRNK za TNF- $\alpha$ i TNFR1 u kori i talamusu PND14 pacova**

Faktor nekroze tumora (TNF) je plejotropni citokin koji se sintetise u fiziološkim odgovorima na infekciju, povredu, ili ishemiju i koji predstavlja jedan od inicijatora spoljašnjeg apoptotskog puta. Njegov receptor, TNFR1, posreduje u TNF-indukovanoj apoptotskoj ćelijskoj smrti (Smith i saradnici, 1994).

U našoj studiji je pokazano da propofolski tretman prolazno povećava ekspresiju iRNK za TNF- $\alpha$  i TNFR1 u obe ispitivane strukture. Ovo je u saglasnosti sa studijom Pešić i saradnika (2009) u kojoj je propofolski tretman istom dozom (25 mg/kg) kod PND7 pacova indukovao porast u ekspresiji TNF- $\alpha$  iRNK, ali i aktivacije kaspaze-3 i finalno doveo do ćelijske smrti. Međutim, bitna razlika između ova dva istraživanja je što u studiji na PND14 pacovima, uprkos detektovanom porastu u ekspresiji iRNK za TNF- $\alpha$  (skoro dvostruko veći nego porast detektovan kod PND7 pacova), nije detektovana neurodegeneracija što ukazuje da je značajna uloga nishodnih odbrambenih mehanizama najverovatnije starosno-zavisna. Moramo da naglasimo i da u ovoj studiji nije praćena ekspresija solubilnog proteina TNF- $\alpha$ , koja je kod PND7 pacova rasla u obe ispitivane strukture (Pešić i saradnici, 2009), tako da ostaje da se utvrdi na koji način propofolski tretman utiče na ovaj citokin na posttranslacionom nivou kod PND14 pacova.

### **5.3.2. Propofolski tretman povećava ekspresiju aktivnog fragmenta kaspaze-3, ali i njegovog inhibitora XIAP proteina u kori i talamusu PND14 pacova**

Nekoliko studija u kojima je anestezija data tokom ranog postnatalnog razvića (PND0-10) su pokazale da opšti anestetici smanjuju ekspresiju neurotrofina, što posledično vodi ka neuroapoptozi (Pešić i saradnici, 2009; Lu i saradnici, 2006). Iako je u ovoj studiji aktivan fragment kaspaze-3 detektovan u obe ispitivane strukture, mi nismo otkrili neurodegeneraciju na histološkom nivou. Sa druge strane, pored kaspaze-3

propofolski tretman je povećao ekspresiju kaspaznog inhibitora XIAP-a u obe ispitivane strukture. Ovo je najverovatnije usled uticaja koje je propofolski tretman imao na pAkt u talamusu i pERK1/2 u kori. Za uzvrat, ovi putevi mogu da stimulišu anti-apoptotske proteine kao što je XIAP koji se vezuje za aktivnu kaspazu-3 i inhibira je (Riedl i saradnici, 2001), što je skoro pokazano u PC12 ćelijama (Lu i saradnici, 2011). Poznato je da je ekspresija XIAP-a neuroprotektivna u mozgu tokom razvića. Wang i saradnici (2004) su pokazali da je u modelu hipoishemične povrede aktivnost kaspaze-3 i -9 praktično ukinuta, kao i da je gubitak tkiva smanjen kod XIAP neonatalnih transgenih miševa u poređenju sa divljim sojem.

U studiji Engelhard i saradnika (2004) je pokazano da je propofol neuroprotektivan u hipokampusu adultnih pacova nakon indukovane cerebralne ishemije. Propofol je imao neuroprotektivni efekat koji se održavao i bio je dugoročan za razliku od prolazne neuroprotekcije izoflurana (Engelhard i saradnici, 2004; Kawaguchi i saradnici, 2000). Cerebralna ishemija je indukovala aktivnu kaspazu-3 koja je služila kao marker apoptotske ćelijske smrti. Međutim, u ovom modelu propofol nije inhibirao ekspresiju aktivirane kaspaze-3, a bitan činilac za ovakav ishod svakako može da bude starost eksperimentalnih životinja. Može se zaključiti da dugoročno propofol može kompletno da inhibira oštećenje neurona nakon cerebralne ishemije, kao i da utiče na apoptotsku ćelijsku smrt koja je u ovom slučaju nezavisna od kaspaze-3 (Engelhard i saradnici, 2004). Sa druge strane, u studiji Briner i saradnika (2010) je pokazano da izlaganje opštim anestheticima ne dovodi do ćelijske smrti, već do promene u arhitekturi dendritskih trnova.

Treba napomenuti da iako se kaspaza-3 često koristi kao apoptotski marker, aktivacija apoptotskih proteaza se može javiti prolazno i u odsustvu ćelijske smrti. Apoptotska biohemijska kaskada može imati lokalno delovanje i služiti fiziološkim ulogama kao što su uobličavanje arhitekture neurita i sinaptičke povezanosti u mladom i zreлом nervnom sistemu (Gilman i Mattson, 2002). Takođe, skoro je pokazano da propofol može da zadrži izofluranom-indukovanu aktivaciju kaspaze-3 *in vivo* i *in vitro* i tako deluje kao neuroprotektivni agens (Zhang i saradnici, 2011). Naši rezultati su u saglasnosti sa drugim studijama u kojima opšta anestezija nije ispoljila neurotoksična svojstva (Engelhard i saradnici, 2004; Briner i saradnici, 2010). Zajedno sa

gorepomenutim studijama, naši podaci ukazuju da neurotoksični efekti opšte anestezije u velikoj meri zavise od razvojnog stadijuma ispitivane životinje.

### **5.3.3. Propofolski tretman ne utiče na broj Fluoro-žad B pozitivnih ćelija u kori i talamusu PND14 pacova**

U cilju potvrde neurodegeneracije na histološkom nivou, koja može biti indukovana propofolom koristili smo Fluoro-žad B bojenje preseka mozgovia PND14 životinja. Ova boja sa visokom specifičnošću obeležava ćelijska tela, distalne dendite i aksone neurona u degeneraciji, međutim s obzirom da može obeležiti i ćelije u procesu nekroze, ne koristi se kao isključivi marker apoptoze (Schmued i Hopkins, 2000a; Schmued i Hopkins, 2000b).

Fluoro-žad B pozitivne ćelije nisu otkrivene na presecima mozgovia ni u kori, ni u talamusu kontrolnih ili tretiranih životinja. Ovaj rezultat nije u saglasnosti sa rezultatima naše grupe u kojoj jednokratna aplikacija iste doze propofola (Pešić i saradnici, 2009) ili višekratna aplikacija propofola (Milanović i saradnici, 2010) dovodi do masovne neurodegeneracije u kori i talamusu PND7 pacova, što opet ukazuje na starosno-zavisni uticaj propofola na indukciju neurodegeneracije. Međutim, dalje nas je zanimalo koja doza propofola indukuje neurodegeneraciju kod PND14 pacova, tako da su životinje tretirane sa višim dozama ovog opšteg anestetika (50, 75 ili 100 mg/kg). Pokazali smo da do pojave neurodegenerativnih ćelija u kori i talamusu PND14 pacova dolazi tek upotrebom doze od 100 mg/kg, koja u ovoj starosnoj grupi predstavlja daleko veću dozu od klinički relevantne.

### **5.3.4. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji NFκB p65 proteina u kori i talamusu PND14 pacova**

Transkripcioni faktor NFκB je jedan od ključnih regulatora imunog odgovora. NFκB se nalazi u aksonima, dendritima i sinaptičkim završecima neurona gde se može brzo aktivirati u odgovoru na razne stimulse kao što su neurotransmiteri, neurotrofini i citokini. Međutim, opseg unutarćelijskih signala i transdukcionih mehanizama koji

regulišu NFκB aktivnost u neuronima je veoma široka i kompleksna. Upravo zbog toga je neophodna identifikacija signalnih puteva koji regulišu preživljavanje i plastičnost.

Poznato je da aktivacija bilo p75 ili TrkA može nishodno aktivirati NFκB (Carter i saradnici, 1996; Foehr i saradnici, 2000). Foehr i saradnici (2000) su pokazali da p75 aktivira p65, p50 i p52 NFκB subjedinice, dok TrkA aktivira samo p50 i p65. Selektivna stimulacija bilo TrkA ili p75, preko NFκB transkripcionog faktora, indukuju setove preklapajućih gena, dok se sa druge strane određeni geni specifično indukuju aktivacijom samo p75 ili samo TrkA receptora (Foehr i saradnici, 2000). Međutim, vezivanje različitih neurotrofina za p75 ne utiče u istoj meri na aktivaciju NFκB (Carter i saradnici, 1996).

Odavno je poznata veza između aktivacije NFκB i PI3K-Akt signalnog puta (Kane i saradnici, 1999; Ozes i saradnici, 1999; Romashkova i Makarov, 1999). Pokazano je da Akt povećava aktivaciju NFκB. Da aktivirana Akt kinaza sinergistički povećava NFκB-posredovanu gensku ekspresiju je prvi put pokazano u T ćelijama nakon tretmana sa forbol-estrima (Kane i saradnici, 1999). Dalje je pokazano da agonisti koji indukuju NFκB aktivaciju, kao što su TNF-α ili PDGF, mogu delom da deluju preko aktivacije Akt-a i tako aktiviraju IKK, ushodnu kinazu koja fosforiliše inhibitornu komponentu IκB (Ozes i saradnici, 1999; Romashkova i Makarov, 1999). Fosforilacijom IκB se pokreće njegova ubikvitinacija i degradacija, čime se oslobađa NFκB u citosolu koji zatim može da se translocira u nukleus gde moduliše gensku ekspresiju. Ovi podaci su u skladu sa našim rezultatima, u kojima NFκB p65 ima isti trend kao i pAkt; u kori njegova ekspresija opada, a u talamusu raste nakon propofolskog tretmana. Međutim, detaljnije proučavanje ekspresije ne samo p65, već i drugih subjedinica ovog transkripcionog faktora je neophodno za bolji uvid u mehanizme delovanja opštih anestetika na ovako važan transkripcioni faktor.

#### **5.4. Uticaj propofolskog tretmana na markere plastičnosti neurona**

Iako nekada smatrana nezamislivim, uznemiravajuća mogućnost da upotreba opštih anestetika tokom ranog postnatalnog razvića može da ima dugotrajne posledice na mozak je privukla pažnju anesteziologa, istraživača, popularnih medija, kao i roditelja. Osnova za ovu brigu proističe uglavnom od rezultata koji su dobijeni

eksperimentalno, a koji ukazuju da izlaganje organizma u ranim fazama postnatalnog razvića anestheticima koji se često koriste u pedijatriji dovodi do kognitivnih i socijalnih deficita u kasnijim fazama života (Jevtovic-Todorovic i saradnici, 2003; Fredriksson i saradnici, 2007; Satomoto i saradnici, 2009). Ovi kognitivni i bihejvioralni poremećaji se mogu pripisati prolaznoj supresiji neurogeneze ili široko rasprostranjenoj neuroapoptozi nakon izlaganja opštim anestheticima (Jevtovic-Todorovic i saradnici, 2003; Stratmann i saradnici, 2009). Kao što je već napomenuto, u slučaju neuroapoptoze nervni sistem je tokom razvića najosetljiviji tokom perioda brze sinaptogeneze (*engl.* brain growth spurt) (Jevtovic-Todorovic i saradnici, 2003; Yon i saradnici, 2005), čime se razviću sinapsi daje glavna uloga u priči o neurotoksičnosti opštih anestetika.

#### **5.4.1. Regulacija sinaptičke plastičnosti putem neurotrofina**

Termin plastičnost mozga se odnosi na sposobnost mozga da se strukturno i funkcionalno menja u odgovoru na različite stimulse. Izgradnja i reorganizacija neuralnih mreža koje predstavljaju glavne procese uključene u neuroplastičnost su regulisane od strane sinaptičke aktivnosti. Usled otkrića da ekscitatorni neurotransmiteri mogu da stimulišu *de novo* transkripciju gena, tako što stimulišu ulazak  $Ca^{2+}$  u postsinapsu, predložen je novi mehanizam po kome stimulusom-inicirana aktivnost neurona može dovesti do dugotrajnih promena u strukturi i funkciji nervnog sistema (West i saradnici, 2001). Pored klasične uloge neurotrofina u podržavanju preživljavanja neurona, danas je poznata i njihova ključna uloga u formiranju neuralnih mreža: od migracije neurona do rearanžiranja lokalnih mreža (Poo, 2001). Kod adulata, neurotrofini su važni posrednici neuronalne plastičnosti koji modulišu rast i remodelovanje aksona i dendrita, utiču na transport i recikliranje membranskih receptora, oslobađanje neurotransmitera, formiranje i pravilno funkcionisanje sinapsi (Lu i saradnici, 2005). Iako je pokazano da lokalna aplikacija neurotrofina indukuje lokalne promene u morfologiji neurona (Campenot, 1977; Poo, 2001), i dalje je nepoznato na kojoj razdaljini neurotrofini mogu ispoljavati svoje dejstvo.

Neurotrofini su dobri kandidati kao pokretači sinaptičke plastičnosti, s obzirom da se eksprimiraju na odgovarajućim mestima, da je njihova ekspresija zavisna od

aktivnosti i da je pokazano da utiču na sinaptičku funkciju, membransku ekscitabilnost kao i neuronalnu morfologiju i konektivnost. U prvim studijama koje su se bavile ispitivanjem uticaja BDNF-a na sinaptičku transmisiju je pokazano da ovaj neurotrofin povećava učestalost minijaturnih ekscitatornih postsinaptičkih struja (*engl.* excitatory postsynaptic currents, EPSC) u kulturi *Xenopus* (Lohof i saradnici, 1993). Od tada je u brojnim studijama pokazano da BDNF ojačava ekscitatorne (glutamatne) sinapse i oslabljuje inhibitorne (GABAergičke) sinapse. Kang i Schuman (1995) su pokazali da izlaganje adultnih preseka hipokampusa BDNF-u dovodi do dugotrajne potencijacije aferentnih vlakana koji prenose informacije u hipokampalne piramidalne ćelije. Dalje studije su potvrdile ulogu BDNF-a u LTP-u (Korte i saradnici, 1995; Patterson i saradnici, 1996; Xu i saradnici, 2003). Još uvek nije najjasnije da li se sinaptička potencijacija indukovana BDNF-om javlja primarno usled presinaptičkog delovanja (preko pojačanja oslobađanja glutamata) ili postsinaptički (putem fosforilacije neurotransmiterskih receptora) (Schinder i Poo, 2000).

#### **5.4.2. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji markera plastičnosti dendrita (proteina MAP-2 i drebrina) u kori i talamusu PND14 pacova**

Dendritska plastičnost, u koju spadaju rast i grananje (arborizacija) dendrita, kao i morfološke promene dendritskih trnova je veoma izražena tokom razvića, a MAP-2 i drebrin predstavljaju markere ovog fenomena. Morfolološka plastičnost dendritskih trnova koja je zavisna od aktivnosti neurona se smatra jednim od glavnih mehanizama remodelovanja neuronalnih kola (Lippman i Dunaevsky, 2005). Ovaj fenomen se ispoljava u vidu dva mehanizma. Prvi mehanizam čine brza i spontana motilnost dendrita, regulisana glutamatnim receptorima, koja menja oblik i veličinu trnova i koja je u korelaciji sa promenama u sinaptičkoj jačini (Fischer i saradnici, 2000). Drugi mehanizam je znatno sporiji, dešava se u okviru nekoliko sati do nekoliko dana, i uključuje nastanak ili gubitak čitave populacije dendritskih trnova (Oray i saradnici, 2006).

Rezultati naše studije ukazuju da propofolski tretman regionalno utiče na ekspresiju MAP-2 proteina (detektovan je pad u kori i porast u talamusu). Sa druge

strane, propofolski tretman je indukovao prolazne poraste u ekspresiji drebrina u obe ispitivane strukture.

Značajan porast fosforilacije MAP-2 je detektovan tokom prva tri dana u kulturi hipokampalnih neurona, kada je arborizacija dendrita bila intenzivna (Diez-Guerra i Avila, 1993). Promene u količini i fosforilacionom statusu MAP-2 proteina su primećene i u različitim neuropatološkim stanjima. Pad u ekspresiji MAP-2, najverovatnije usled aktivnosti kalpainom-posredovane proteolize, može poslužiti kao rani indikator ishemijom-indukovane neurodegeneracije u različitim animalnim modelima (Ballough i saradnici, 1995; Raley-Susman i Murata, 1995; Folkerts i saradnici, 1998). Sličan gubitak MAP-2 je detektovan i u intoksikaciji alkoholom (Norberg i Zimmer, 1998). U drugim neurološkim poremećajima vezanim za ekscitotoksičnost, pad u ekspresiji MAP-2 najstaje najverovatnije aktivacijom kalpaina usled prevelikog influksa  $Ca^{2+}$  u neurone (Hicks i saradnici, 1995; Arias i saradnici, 1997). MAP-2 modifikacije su primećene u odgovorima na farmakološke tretmane. Pokazano je da neki antidepresivi povećavaju specifične promene u PKA-zavisnoj fosforilaciji MAP-2 u kori pacova, bez uticaja na količinu MAP-2 (Perez i saradnici, 1989). Možemo pretpostaviti da propofolski tretman u našoj studiji, na regionalno-zavisan način stimuliše arborizaciju dendrita. Na žalost, nismo ispitivali morfologiju dendrita što bi dodatno potvrdilo ovu pretpostavku i dalo uvid u stabilnost dendritskih trnova u zavisnosti od toga da li bi propofol indukovao „trnove pamćenja“ ili „trnove učenja“. S obzirom da MAP-2 predstavlja supstrat u mnogim neuronalnim putevima signalne transdukcije, bilo kakve promene u fosforilacionom stanju i/ili podložnosti proteolizi ovog proteina mogu se odraziti na važne modifikacije u strukturi neurona.

Pored MAP-2 proteina, i drebrini učestvuju u uspostavljanju i održavanju dendritskih trnova u neuronima. Pokazano je da se klasteri drebrina A, koji predstavlja neuron-specifičnu adultnu formu, obrazuju na sinapsama i upravo oni upravljaju usmeravanjem PSD-95 (*engl.* post-synaptic density 95) ka sinapsama tokom normalnog razvića (Takahashi i saradnici, 2006) ili nakon prekomerne ekspresije drebrina (Mizui i saradnici, 2005). Pokazano je da drebrini stabilizuju pukotinaste veze (*engl.* *gap junctions*) bogate koneksinima-43 na plazma membrani (Majoul i saradnici, 2007). S obzirom da u našoj studiji propofolski tretman utiče na ekspresiju drebrina na isti način u obe ispitivane strukture, moguće je da su funkcije drebrina, u ovom slučaju pre



okrenute ka formiranju stabilnih domena plazma membrane, nego ka oblikovanju ćelijskih nastavaka.

Kao što je već napomenuto, morfologija dendritskih trnova je u korelaciji sa stabilnošću i jačinom sinapse (Nimchinsky i saradnici, 2002). Pečurkasti dendriti, koji imaju uzak vrati i široku glavu, su stabilni duži vremenski period i zovu se „trnovi pamćenja“. Ovaj tip je najviše zastupljen u zrelom CNS-u. Za razliku od toga, tanki trnovi sa malom glavom su visoko pokretljive strukture koje mogu da menjaju oblik u roku od nekoliko minuta do nekoliko dana. Ovi mali trnovi dominiraju kod glutamatnih sinapsi, što ukazuje da imaju veliki kapacitet za plastičnost zavisnu od aktivnosti, i zbog toga su nazvani „trnovi učenja“ (Nimchinsky i saradnici, 2002; Alvarez i Sabatini, 2007). Briner i saradnici (2010) su ispitali efekte tri anestetika na broj i morfologiju dendritskih trnova u postsinaptičkim kortikalnim neuronima. U dendritskim trnovima se smeštaju najvažniji molekuli uključeni u postsinaptičku signalizaciju i plastičnost, uključujući neurotransmitterske receptore, citoskeletne proteine i signalne molekule (Nimchinsky i saradnici, 2002; Alvarez i Sabatini, 2007; Holtmaat i Svoboda, 2009). Najveći broj ekscitatornih glutamatnih veza je sačinjen od dendritskih trnova, tako da merenje gustine dendritskih trnova omogućava uvid u gustinu ekscitatornih sinapsi (Holtmaat i Svoboda, 2009). Briner i saradnici (2010) su pokazali da kada se PND16 glodari izlože klinički relevantnim koncentracijama izoflurana, sevoflurana ili dezflurana (u trajanju 30-120 minuta) dolazi do značajnog porasta gustine dendritskih trnova u petom sloju piramidalnih neurona prefrontalne kore. Pored toga, gotovo svi novi trnovi su imali specifičnu morfologiju; bili su tanki, a ne pečurkasti. Takođe je postojala razlika između ova tri anestetika u trajanju anestezije koja je neophodna da indukuje porast gustine trnova (30 min za sevofluran, 60 min za izofluran i 120 min za dezfluran). Vrlo bitno je istaći da ove doze kod PND16 životinja nisu dovele do apoptoze neurona, za razliku od PND7 životinja. Pokazano je i da midazolam, propofol i ketamin indukuju sličan porast u gustini dendritskih trnova kortikalnih neurona kod PND15 i 20, ali ne i PND30 miševa. Ovi novi trnovi su tanki, traju do 5 dana nakon izlaganja anestetiku, a njihov značajni deo postaje funkcionalan i integrisan u neuronalne mreže (De Roo i saradnici, 2009). Ovi rezultati su u suprotnosti sa skorijom studijom koja je pokazala da nakon primene izoflurana dolazi do značajnog gubitka dendritskih trnova i smanjenja broja sinapsi u kulturi hipokampalnih neurona i

hipokampusu glodara (Head i saradnici, 2009). Međutim, razlike između ovih studija su sledeće: u studiji Head i saradnika (2009) izlaganje anestheticima je bilo u PND7 i neuronalna apoptoza je bila značajna. Sa druge strane, u studiji Briner i saradnika (2010) kod PND16 miševa nije detektovan gubitak neurona. Ovaj prelaz iz osetljivosti na anestezijom-indukovanu neuroapoptozu (koji je na vrhuncu oko PND7) ka otpornosti (oko PND14) je već opisana u literaturi (Jevtovic-Todorovic i saradnici, 2003; Head i saradnici, 2009) i može se povezati sa činjenicom da je GABA ekscitatorna kod PND7 i inhibitorna kod PND16. Rezultati gorepomenutih studija, ukazuju da često korišćeni anestetici i sedativi dovode do sinaptičkog remodelovanja koje je starosno-zavisno.

#### **5.4.3. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji GAP-43 proteina u kori i talamusu PND14 pacova**

Neuronski protein GAP-43 ima brojne funkcije koje se tiču izduživanja aksona, sinaptičke plastičnosti i regulacije procesa preživljavanja i smrti neurona. Međutim, molekularni mehanizmi njegovog delovanja u ovim procesima nisu u potpunosti istraženi. Odavno je postavljeno pitanje da li se aksoni izdužuju konstitutivno ili u odgovoru na određene stimulse. Danas je poznato da vanćelijski stimulusi indukuju izduživanje aksona (Goldberg, 2003). U ove stimulse spadaju neurotrofini, vanćelijski matriksni molekuli laminin, heparan sulfat proteoglikani, kao i ćelijski adhezivni molekuli kao što su L1 i N-kadherin (Goldberg, 2003).

Zanimljivo je da u našoj studiji nakon propofolskog tretmana ekspresija GAP-43 pokazuje isti regionalno-specifični trend kao i ekspresija MAP-2 (detektovan je pad u kori i porast u talamusu). Međutim, dalja istraživanja su neophodna da bi se utvrdilo da li u talamusu nakon propofolskog tretmana dolazi do morfoloških promena kao što su izduživanje aksona i arborizacija dendrita. Sa druge strane, postavlja se i pitanje da li su ove promene pokrenute upravo grubim porastom u ekspresiji BDNF proteina koji je detektovan u talamusu i koji predstavlja jedan od faktora koji utiču na morfologiju neurona (McAllister i saradnici, 1997; Murphy i saradnici, 1998; Horch i Katz, 2002; Tolwani i saradnici, 2002).

Pokazano je da NGF povećava ekspresiju GAP-43 u PC12 ćelijama, tako što povećava poluživot GAP-43 iRNK (Perrone-Bizzozero i saradnici, 1991). Takođe je

pokazano da je fosforilisani GAP-43 neophodan kada neuralni adhezioni molekuli interaguju sa konusom rasta (Meiri i saradnici, 1998). Kada se, na primer, N-kadherin koji je na spoljašnjoj površini konusa rasta veže za odgovarajući supstrat, dolazi da formiranja klastera FGF receptora i njihove aktivacije što vodi ka fosforilaciji GAP-43, promeni stanja citoskeleta i produžavanja konusa rasta (Dunican i Doherty, 2000). Iako GAP-43 nije neophodan za formiranje konusa rasta, njegovo prisustvo je neophodno za odgovarajuće usmeravnje i izrastanje aksona (Strittmatter i saradnici, 1995). Prekomerna ekspresija GAP-43 u dorzalnom korenu kičmene moždine je dovela do povećanog izduživanja aksona *in vitro*, kao i *in vivo* u modelu povrede kičmene moždine (Bomze i saradnici, 2001).

GAP-43 *knockout* miševi nisu uspeli da formiraju anteriornu komisuru, hipokampalne komisure i korpus kalozum *in vivo* (Shen i saradnici, 2002). Pored toga, pokazano je da je GAP-43 neophodan za normalno razviće serotoninske inervacije u prednjem mozgu, kao i za izrastanje aksona i terminalno grananje serotoninskih aksona iz rafe (Donovan i saradnici, 2002). Ovi miševi praktično nisu imali serotoninsku inervaciju u kori i hipokampusu, a pokazano je da se abnormalnosti u serotoninskoj inervaciji povezuju sa shizofrenijom, depresijom, anksioznošću i autizmom (Donovan i saradnici, 2002).

Pored GAP-43 proteina, u ovoj studiji smo ispitali i ekspresiju fragmenata GAP-43 proteina. Pokazano je da u aksonskim završecima GAP-43 predstavlja supstrat za kalcijum-zavisnu cistein proteazu m-kalpain koja učestuje u indukciji ćelijske smrti i sprečavanju izduživanja aksonskog konusa rasta (Zakharov i Mosevitsky, 2007). U presinaptičkim završecima m-kalpain iseca GAP-43 blizu pozicije Ser41. Fosforilacija ove pozicije pomoću PKC ili vezivanje GAP-43 za kalmodulin skoro u potpunosti suprimira proteolizu. Fragment GAP-43 kome nedostaje oko 40 N-terminalnih aminokiselinskih ostataka (nazvan GAP-43-3) je produkt ove proteolize. Sa druge strane, ovaj fragment je sprečio kompletno isecanje intaktnog GAP-43 od strane m-kalpaina mehanizmom povratne sprege, kao i isecanje kazeina, drugog supstrata kalpaina (Zakharov i Mosevitsky, 2007). U našoj studiji, fragmenti GAP-43 su visoko eksprimirani u obe ispitivane strukture u periodu 8-24 sati nakon tretmana. U našem modelu propofolski tretman, bez obzira što različito utiče na ekspresiju GAP-43 proteina u kori i talamusu, u ovim strukturama podjednako utiče na nastanak fragmenata

ovog proteina. Možemo pretpostaviti da GAP-43 fragmenti, koji su prisutni u obe ispitivane strukture u visokim količinama, mogu imati važnu ulogu u regulaciji aktivnosti m-kalpaina u neuronima, kao i da učestvuju u modulaciji neuronalnih odgovora na apoptotske signale.

#### **5.4.4. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji sinaptofizina u kori i talamusu PND14 pacova**

Hemijske sinapse se karakterišu specijalizovanim unutarćelijskim odeljcima u pre- i postsinaptičkim neuronima. Presinaptički završeci su specijalizovane strukture sa mnoštvom sinaptičkih vezikula koje sadrže neurotransmitere, kao i sa aktivnim zonama koje omogućavaju fuziju vezikula i oslobađanje neurotransmitera u sinaptičku pukotinu. Region postsinaptičkog neurona koji se nalazi nasuprot presinaptičkog završetka sadrži visoke koncentracije neurotransmiterskih receptora, kanala i nishodnih signalnim molekula bitnih za prenos signala kroz sinapsu.

Sinaptofizin je glavni integralni membranski protein sinaptičkih vezikula (predstavlja oko 10% ukupnih proteina sinaptičkih vezikula) i prvi je identifikovani protein nervnih završetaka (Jahn i saradnici, 1985). Uloge sinaptofizina u endocitozi i recikliranju sinaptičkih vezikula su poznate. S obzirom da je sinaptofizin isključivo lokalizovan u sinaptičkim vezikulama, koristi se kao presinaptički marker.

U našem modelu propofolski tretman je indukovao porast u ekspresiji sinaptofizina u kori i pad u talamusu. Međutim, ostaje da se dalje ispita zašto je ovaj trend u suprotnosti sa trendovima ostalih ispitivanih markera sinaptičke plastičnosti (MAP-2, GAP-43, sinuklein, N-kadherin). Možemo reći da propofolski tretman na kompleksan način moduliše sinaptičku plastičnost. Takođe se postavlja i pitanje zrelosti određenih regiona mozga tokom ranog postnatalnog razvika i uloge različitih sinaptičkih markera u tim stanjima.

Sinaptofizin stupa u kalcijum-zavisne interakcije sa dinamin I GTP-azom čija je aktivnost neophodna za endocitozu sinaptičkih vezikula (Daly i Ziff, 2002). Sinaptofizin se vezuje i za holesterol i ova interakcija je važna za biogenezu mikrovezikula u neuroendokrinim ćelijama (Thiele i saradnici, 2000). Porast u imunoreaktivnosti sinaptofizina je najčešće povezana sa porastom broja presinaptičkih završetaka, što se

odražava na nastanak sinapsi (Eastwood i saradnici, 1994). Pokazan je dozna-zavisan efekat genisteina na porast u ekspresiji sinaptofizina (Chindewa i saradnici, 2007), a pokazano je i da stimulacija brkova pacova povećava ekspresiju sinaptofizin iRNK (Ishibashi, 2002). Sa druge strane padovi u ekspresiji sinaptofizina često predstavljaju obeležje raznih neuropatoloških stanja kao što su shizofrenija, Alchajmerova bolest i druga oboljenja (Eastwood i saradnici, 1995; Callahan i saradnici, 1999).

Moramo da naglasimo da naši rezultati nisu u saglasnosti sa studijama u kojim je pokazana pozitivna korelacija u ekspresiji BDNF proteina i sinaptofizina u drugim regionima mozga. U studiji Coffey i saradnika (1997) je pokazano da u kulturi granularnih ćelija malog mozga BDNF, ali ne i NGF brzo (u okviru 2 sata) indukuju porast u nivoima sinaptofizina, tau i c-Fos proteina, ali ne i GAP-43, što je u korelaciji sa ekspresijom TrkB receptora.

#### **5.4.5. Propofolski tretman povećava ekspresiju sinukleina-1 u kori i talamusu PND14 pacova**

Protein koji je kodiran iRNK za sinuklein-1 je pacovski homolog humanom  $\alpha$ -sinukleinu (Ueda i saradnici, 1993). Odavno su poznate uloge sinukleina-1 ( $\alpha$ -sinukleina) u neurodegenerativnim stanjima. Mutacije ovog gena su povezane sa nastankom Parkinsonove i Alchajmerove bolesti, kao i drugih neurodegenerativnih sinukleinopatija. Međutim, bez obzira na uloge koje sinukleini imaju u patološkim stanjima, normalne fiziološke uloge  $\alpha$ -sinukleina, koji je bogato zastupljen u presinaptičkim nervnim završecima, jos uvek nisu u potpunosti otkrivene. Ostaje i da se istraži uloga sinukleina tokom razvića, jer je u brojnim studijama pokazano da su sinukleini veoma zastupljeni u mozgu tokom ranog postnatalnog razvića i da njihova ekspresija postepeno opada sa sazrevanjem (Hsu i saradnici, 1998; Petersen i saradnici, 1999). U studiji Petersen i saradnika (1999) metodom *in situ* hibridizacije je pokazano da je ekspresija  $\alpha$ -sinuklein iRNK kod glodara, od rođenja do druge godine života, najviša u 14 postnatalnom danu. Upravo ova visoka ekspresija  $\alpha$ -sinuklein tokom razvića ukazuje na funkcije ovog proteina u oblikovanju i održavanju sinaptičkih funkcija.

Postoji nekoliko dokaza koji ukazuje na ulogu sinukleina u procesima vezanim za membranu presinaptičkih završetaka:  $\alpha$ -sinuklein je povišeno eksprimiran u određenoj populaciji presinaptičkih završetaka u mozgu ptica pevačica tokom perioda sinaptičkih rearanžiranja tokom učenja novih pesama (George i saradnici, 1995). Jedne od potencijalnih uloga koje sinukleini mogu imati u fiziološkim uslovima su i u regulaciji sinteze i oslobađanja monoaminskih neurotransmitera (Ostrerova i saradnici, 1999; Perez i saradnici, 2002), kao i u regulaciji integriteta mreže neurofilamenata (Buchman i saradnici, 1998; Surguchov i saradnici, 2001).

Ekspresija drugog presinaptičkog markera sinaptofizina je prisutna u praktično svim nervnim završecima i pokazano je da je u korelaciji sa sinaptičkom gustinom (Leclerc i saradnici, 1989). U mnogim studijama je pokazana ko-ekspresija  $\alpha$ -sinukleina sa sinaptofizinom, sinaptotagminom i sinapsinom (George i saradnici, 1995; Iwai i saradnici, 1995; Petersen i saradnici, 1999). U našoj studiji je pokazano da tretman propofolom na isti način utiče na ekspresiju sinaptofizina i sinukleina u kori PND14 pacova, dok u talamusu ova dva proteina imaju suprotne profile: ekspresija sinaptofizina opada, dok ekspresija sinukleina raste. Ostaje da se dodatno ispita zašto nakon propofolskog tretmana dolazi da regionalno-specifičnih razlika u ekspresiji ova dva proteina za koje je poznato da imaju bitne uloge u oblikovanju i održavanju sinaptičkih funkcija. Na osnovu toga, možemo pretpostaviti da sinuklein i sinaptofizin u istom periodu tokom razvika imaju različite funkcije koje se tiču sinaptičke plastičnosti i na koje utiče propofolski tretman.

#### **5.4.6. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji N-kadherina u kori i talamusu PND14 pacova**

Transmembranski adhezioni proteini u koje spada N-kadherin se smatraju jednim od učesnika u formiranju novih sinapsi. Kadherini predstavljaju familiju kalcijum-zavisnih adhezivnih molekula (Yoshida i Takeichi, 1982).

Ubrzo nakon susretanja aksonskih i dendritskih filopodija kadherin/katenin kompleksi se akumuliraju na mestima ovih kontakata (Togashi i saradnici, 2002). Tokom sinaptogeneze, inhibicija adhezije dve ćelije koja je posredovana kadherinima sprečava morfološke promene denritskih filopodija u trnove što destabilizuje kontakt aksona i

dendrita dve susedne ćelije (Togashi i saradnici, 2002; Abe i saradnici, 2004; Okuda i saradnici, 2007). Sa druge strane, povećana ekspresija kadherin/katenin kompleksa u neuronima tokom sinaptogeneze utiče na stabilizaciju sinaptičkih kontakata, u smislu da se glave dentritskih trnova povećavaju, skraćuje se dužina trna, i raste sinaptička gustina (Abe i saradnici, 2004). Zanimljivo je da inhibicija kadherin/katenin kompleksa u zrelim neuronima ima slab uticaj na morfologiju dendritskih trnova na mestu sinapsi (Togashi i saradnici, 2002). Međutim, moguće je da pored kadherina i neki drugi ćelijski adhezioni molekuli utiču na adheziju dve ćelije u zrelim sinapsama.

Promene u sinaptičkoj aktivnosti su uzročnici remodelovanja sinapsi, a kadherin/katenin kompleksi su dinamički regulisani sinaptičkom aktivnošću. Pojačana aktivnost neurona povećava akumulaciju kadherina na sinapsama, dok blokiranje aktivnosti neurona pomoću tetrodotoksina smanjuje količinu kadherin/katenin kompleksa u sinapsama (Murase i Schuman, 1999; Abe i saradnici, 2004; Abe i Takeichi 2007). U našem modelu, ekspresija N-kadherina je smanjena u kori, a povećana u talamusu. Moguće je da propofolski tretman jače deluje na aktivnost neurona u talamusu u odnosu na koru, a pored toga je poznato da je jedna od osnovnih funkcija talamusa da filtrira informacije ka kori i na taj način ga štiti.

Lokalizacija kadherinskih molekula na mestu kontakta filopodija-akson ukazuje da oni utiču na stabilizaciju kontakata, koja može da pokrene sazrevanje dendritskih trnova i sinaptičku diferencijaciju. Inhibicija kadherinskih kontakata sprečava sazrevanje trnova i dendritski nastavci onda zadržavaju dugačku i nezrelu filopodijalnu morfologiju (Salinas i Price, 2005). U tom smislu, pošto ekspresija N-kadherina i MAP-2 u našoj studiji pokazuje iste trendove u obe ispitivane strukture (detektovan je pad u talamusu i porast u kori), možemo pretpostaviti da propofolski tretman pozitivno utiče na sazrevanje dendritskih trnova u talamusu. Sa druge strane, postavlja se pitanje da li propofolski tretman utiče na eliminaciju viška sinapsi u kori ili u ovoj strukturi, koja je u ovom periodu razvija zrelija od talamusa, kadherini nemaju bitnu ulogu u morfološkim rearanžiranjima dendrita, već te funkcije preuzimaju neki drugi adhezioni molekuli. Preciznija morfološka ispitivanja bi dala odgovore na ova pitanja.

## 6. ZAKLJUČCI

Eksperimenti urađeni u okviru ove doktorske disertacije su ukazali na značajne promene u nivou ispitivanih neurotrofina, njihovih receptora i nishodnih efektorskih kinaza u kori i talamusu PND14 pacova nakon tretmana propofolom (25 mg/kg). Takođe je pokazano da tretman ne izaziva ćelijsku smrti, već dovodi do znatnih promena u ekspresiji markera sinaptičke plastičnosti u obe ispitivane strukture eksperimentalnih životinja.

U prvom delu ove disertacije je pokazano da tretman propofolom indukuje promene u signalnom putu neurotrofina u mozgu PND14 pacova. Iz diskutovanih rezultata se mogu izvesti sledeći zaključci:

1. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji BDNF iRNK i proteina (proBDNF i zreli BDNF) u kori i talamusu PND14 pacova i može se zaključiti da propofolski tretman brzo reguliše BDNF na posttranslacionom nivou, kao i da su promene u zastupljenosti zrelog BDNF-a znatno intenzivnije u talamusu nego u kori.
2. Propofolski tretman utiče na ekspresiju ukupnog i fosforilisanog TrkB receptora na vremenski- i regionalno-zavisan način u kori i talamusu PND14 pacova. U skladu sa dobijenim podacima vezanim za ekspresiju zrelog BDNF proteina i TrkB receptora (ukupnog i fosforilisanog), može se postaviti hipoteza da blagi porast u nivou BDNF-a uglavnom pokreće brze promene u količinu TrkB receptora, dok veliki porast BDNF nivoa uglavnom utiče na aktivnost TrkB receptora, a ne njihovu količinu. Takođe, u skladu sa rezultatima za pTrkB i jezgro pTrkB, možemo pretpostaviti da u kori nakon propofolskog tretmana dolazi i do deglikozilacije ovog receptora, što nije slučaj sa talamusom.
3. Propofolski tretman utiče na ekspresiju NGF iRNK i proteina (proNGF i zreli NGF) u kori i talamusu PND14 pacova i možemo zaključiti da je ekspresija neurotrofina BDNF i NGF različito regulisana u odgovoru na propofolski tretman i da se najznačajnije promene u PND14 mozgu odigravaju preko BDNF signalnog puta i u mnogo manjoj meri preko NGF signalnog puta.
4. Propofolski tretman povećava ekspresiju fosforilisanog TrkA receptora u obe ispitivane strukture, dok je ekspresija jezgra pTrkA receptora različito regulisana:



detektovan je porast u kori i pad u talamusu. U skladu sa prethodnim rezultatima, možemo zaključiti da ekspresija NGF-a ne utiče na aktivnost TrkA receptora, kao i da propofolski tretman na regionalno-specifičan način utiče na deglikozilaciju i internalizaciji TrkA receptora.

5. Propofolski tretman prolazno povećava ekspresiju p75 receptora u obe ispitivane strukture i smatramo da u našem modelu p75 deluje kao Trk koreceptor čije funkcije zavise od prostorne distribucije u mozgu.
6. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji nishodnih fosforilisanih Akt kinaza (pAkt Thr308 i pAkt Ser473), a ne utiče na ekspresiju ukupnih Akt kinaza u kori i talamusu PND14 pacova. Možemo zaključiti da propofolski tretman utiče na kinaznu aktivnost Akt-a, a ne na njegovu količinu, kao i da postoje regionalno-specifične razlike u uticaju propofolskog tretmana na fosforilaciju određenih pozicija Akt kinaze.
7. Propofolski tretman utiče na ekspresiju fosforilisanih, ali ne i ukupnih ERK1/2 kinaza u kori i talamusu PND14 pacova. Možemo zaključiti da propofolski tretman ne utiče na količinu, već na kinaznu aktivnost ERK1/2. Takođe, u skladu sa prethodnim rezultatima možemo zaključiti da postoji regionalno-zavisna recipročna regulacija Akt i ERK kinaza.

U drugom delu ove disertacije ispitivan je potencijal propofolskog tretmana da izazove apoptotsku neurodegeneraciju u mozgu PND14 pacova:

8. Propofolski tretman prolazno povećava ekspresiju iRNK za TNF- $\alpha$  u obe ispitivane strukture. Isti trend je detektovan i u slučaju ekspresije receptora za TNF- $\alpha$  (TNFR1).
9. Propofolski tretman prolazno povećava ekspresiju aktivnog fragmenta kaspaze-3, ali i njegovog inhibitora XIAP proteina u kori i talamusu PND14 pacova. Na histološkom nivou nisu detektovane Fluoro-žad B pozitivne ćelije, osim kada je primenjena doza propofola od 100 mg/kg koja predstavlja daleko veću dozu od klinički relevantne. Možemo zaključiti da je XIAP inhibirao aktivnost kaspaze-3 najverovatnije usled uticaja koje je propofolski tretman imao na pAkt u talamusu i pERK1/2 u kori.
10. Propofolski tretman izaziva regionalno-specifične promene u ekspresiji NF $\kappa$ B p65 proteina u kori i talamusu PND14 pacova. S obzirom da pAkt i NF $\kappa$ B p65 imaju iste

trendove u ispitivanim strukturama, možemo zaključiti da aktivirana Akt kinaza najverovatnije sinergistički povećava NF $\kappa$ B-posredovanu gensku ekspresiju.

U trećem delu ove disertacije ispitivan je potencijal propofolskog tretmana da izazove promene u ekspresiji markera sinaptičke plastičnosti u mozgu PND14 pacova:

11. Propofolski tretman regionalno utiče na ekspresiju MAP-2 proteina, tako da je moguće je da tretman na regionalno-zavisan način stimuliše arborizaciju dendrita. S obzirom da tretman utiče na ekspresiju drebrina na isti način u obe ispitivane strukture, moguće je da su funkcije drebrina pre okrenute ka formiranju stabilnih domena plazma membrane, nego ka oblikovanju ćelijskih nastavaka.
12. Propofolski tretman na regionalno-zavisan način utiče na ekspresiju GAP-43, međutim preciznija morfološka ispitivanja bi dodatno potvrdila da li u talamusu dolazi do izduživanja aksona. Isti tretman dovodi do porasta u ekspresiji GAP-43 fragmenata u obe ispitivane strukture, za koje se zna da učestvuju u modulaciji odgovora neurona na apoptotske signale.
13. Propofolski tretman na isti način utiče na ekspresiju presinaptičkih markera (sinaptofizina i sinukleina-1) u kori PND14 pacova, dok u talamusu ova dva proteina imaju suprotne profile. Možemo zaključiti da ova dva proteina u istom periodu tokom razvika imaju različite funkcije koje se tiču sinaptičke plastičnosti i na koje utiče propofolski tretman.
14. Propofolski tretman na regionalno-zavisan način utiče na ekspresiju N-kadherina, što može pozitivno uticati na sazrevanje dendritskih trnova u talamusu. Međutim, preciznija morfološka ispitivanja bi dodatno potvrdila ovu pretpostavku.

Zaključno, rezultati ove doktorske disertacije imaju potencijalne implikacije u kliničkoj pedijatriji koje treba uzeti u obzir prilikom razmatranja starosno-zavisne komponente neurotoksičnosti i neuroplastičnosti koje izaziva primena opštih anestetika.

## 7. LITERATURA

- Abe K, Chisaka O, Van Roy F, Takeichi M (2004) Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by alpha N-catenin. *Nat Neurosci* 7:357–363.
- Abe K, Takeichi M (2007) NMDA-receptor activation induces calpain-mediated beta-catenin cleavages for triggering gene expression. *Neuron* 53:387–397.
- Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A (2000) Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25:239–252.
- Aebbersold DM, Shaul YD, Yung Y, Yarom N, Yao Z, Hanoch T, Seger R (2004) Extracellular signal-regulated kinase 1c (ERK1c), a novel 42-kilodalton ERK, demonstrates unique modes of regulation, localization, and function. *Mol Cell Biol* 24:10000–10015.
- Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T (2007) Mouse and Rat BDNF Gene Structure and Expression Revisited. *Journal of Neuroscience Research* 85:525–535.
- Aigner L, Caroni P (1995) Absence of persistent spreading, branching, and adhesion in GAP-43-depleted growth cones. *J Cell Biol* 128:647–660.
- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15:6541–6551.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Ba. *Curr Biol* 7:261–269.
- Al-Jahdari WS, Saito S, Nakano T, Goto F (2006) Propofol induces growth cone collapse and neurite retractions in chick explants culture. *Can J Anaesth* 53:1078–1085.
- Allegaert K, de Hoon J, Verbesselt R, Naulaers G, Murat I (2007) Maturation pharmacokinetics of single intravenous bolus of propofol. *Paediatr Anaesth* 17:1028–1034.
- Allegaert K, Vancraeynest J, Rayyan M, de Hoon J, Cossey V, Naulaers G, Verbesselt R (2008) Urinary propofol metabolites in early life after single intravenous bolus. *British Journal of Anaesthesia* 101:827–831.
- Al-Shawi R, Hafner A, Chun S, Raza S, Crutcher K, Thrasivoulou C, Simons P, Cowen T (2007) ProNGF, sortilin, and age-related neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1119:208-215.
- Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, Lindsay RM, Wiegand SJ (1997) Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389:856–860.
- Altar CA, DiStefano PS (1998) Neurotrophin trafficking by anterograde transport. *Trends Neurosci* 21:433–437.
- Alvarez VA, Sabatini B (2007) Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 30:79–97.
- Angeletti RH, Bradshaw RA, Wade RD (1971) Subunit structure and amino acid composition of mouse submaxillary gland nerve growth factor. *Biochemistry* 2:10463–10469.
- Antognini JF, Carstens E (1998) Macroscopic sites of anesthetic action: brain versus spinal cord. *Toxicol Lett* 100–101:51–58.

- Antognini JF, Carstens E (2002) In vivo characterization of clinical anaesthesia and its components. *Br J Anaesth* 89:156–166.
- Arevalo JC, Wu SH (2006) Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci* 63:1523–1537.
- Arhem P, Klement G, Nilsson J (2003) Mechanisms of anesthesia: towards integrating network, cellular, and molecular level modeling. *Neuropsychopharmacology* 28:40–47.
- Arias C, Arrieta I, Massieu L, Tapia R (1997) Neuronal damage and MAP2 changes induced by the glutamate transport inhibitor dihydrokainate and by kainate in rat hippocampus in vivo. *Exp Brain Res* 116:467–476.
- Back SA, Gan X, Li Y, Rosenberg PA, Volpe JJ (1998) Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *J Neurosci* 18:6241–6253.
- Baeuerle PA, Baltimore D (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell* 87:13–20.
- Ballough GPH, Martin LJ, Cann FJ, Graham JS, Smith CD, Kling CE, Forster JS, Phann S, Filbert MG (1995) Microtubule-associated protein 2(MAP-2): a sensitive marker of seizure-related brain damage. *J Neurosci Meth* 61:23–32.
- Barbacid M (1994) The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 25:1386–1403.
- Barde YA (1990) The nerve growth factor family. *Prog Growth Factor Res* 2:237–248.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1:549–553.
- Barger SW, Horster D, Furukawa K, Goodman Y, Kriegelstein J, Mattson MP (1995) Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca<sup>2+</sup> accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9328–9332.
- Basi GS, Jacobson RD, Virag I, Schilling J, Skene JHP (1987) Primary structure and transcriptional regulation of GAP-43, a protein associated with nerve growth. *Cell* 49:785–791.
- Bastrikova N, Gardner GA, Reece JM, Jeromin A, Dudek SM (2008) Synapse elimination accompanies functional plasticity in hippocampal neurons. *PNAS* 105:3123–3127.
- Bax B, Blundell TL, Murray-Rust J, McDonald NQ (1997) Structure of mouse 7S NGF: a complex of nerve growth factor with four binding proteins. *Structure* 5:1275–1285.
- Bazzoni F, Beutler B (1996) The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 334:1717–1725.
- Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN (1991) A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254:274–277.
- Ben-Ari Y, Spitzer NC (2010) Phenotypic checkpoints regulate neuronal development. *Trends Neurosci* 33:485–492.
- Benowitz LI, Routtenberg A (1997) GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 20:84–91.

- Bercker S, Bert B, Bittigau P, Felderhoff-Muser U, Buhner C, Ikonomidou C, Weise M, Kaisers UX, Kerner T (2009) Neurodegeneration in Newborn Rats Following Propofol and Sevoflurane Anesthesia. *Neurotox Res* 16:140–147.
- Bezzi P, Volterra AA (2001) Neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr Opin Neurobiol* 11:387–394.
- Bhutta AT, Anand KJS (2002) Vulnerability of the developing brain: Neuronal mechanisms. *Clin Perinatol* 29:357–372.
- Bierl MA, Isaacson LG (2007) IncreasedNGFproforms in aged sympathetic neurons and their targets. *Neurobiol. Aging* 28:122–134.
- Binder LI, Frankfurter A, Kim H, Caficares A, Payne MR, Rebhun LI (1984) Heterogeneity of microtubule-associated protein 2 during rat brain development. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5613–5617.
- Bjornstrom K, Turina D, Loverock A, Lundgren S, Wijkman M, Lindroth M, Eintrei Ch (2008) Characterization of the signal transduction cascade caused by propofol in rat neurons: from the GABA A receptor to the cytoskeleton. *J Physiol Pharmacol* 59:617–632.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385:729–733.
- Blum R, Konnerth A (2005) Neurotrophin-Mediated Rapid Signaling in the Central Nervous System: Mechanisms and Functions. *PHYSIOLOGY* 20:70–78.
- Boggio EM, Putignano E, Sassoè-Pognetto M, Pizzorusso T, Giustetto M (2007) Visual stimulation activates ERK in synaptic and somatic compartments of rat cortical neurons with parallel kinetics. *PLoS One* 2:e604.
- Bomze HM, Bulsara KR, Iskandar BJ, Caroni P, Skene JHP (2001) Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons. *Nat Neurosci* 4:38–43.
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and –independent mechanisms. *Science* 286:1358–1362.
- Boulton TG, Cobb MH (1991) Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul* 2:357–371.
- Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH (1990) An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249:64–67.
- Briggs LP, Clarke RS, Watkins J (1982) An adverse reaction to the administration of disopropofol (Diprivan). *Anaesthesia* 37:1099–1101.
- Briner A, De Roo M, Dayer A, Muller D, Habre W, Vutskits L (2010) Volatile anesthetics rapidly increase dendritic spine density in the rat medial prefrontal cortex during synaptogenesis. *Anesthesiology* 112:546–556.
- Bruno MA, Cuello AC (2006) Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6735–6740.

- Buchman VL, Adu J, Pinon LG, Ninkina NN, Davies AM (1998) Persyn, a member of the synuclein family, influences neurofilament network integrity. *Nat Neurosci* 1:101–103.
- Butowt R, von Bartheld CS (2001) Sorting of internalized neurotrophins into an endocytic transcytosis pathway via the Golgi system: ultrastructural analysis in retinal ganglion cells. *J Neurosci* 21:8915–8930.
- Butowt R, von Bartheld CS (2005) Anterograde axonal transport of BDNF and NT-3 by retinal ganglion cells: roles of neurotrophin receptors. *Mol Cell Neurosci* 29:11–25.
- Butz M, Worgotter F, van Ooyen A (2009) Activity-dependent structural plasticity. *Brain Res Rev* 6:287–305.
- Caleo M, Medini P, von Bartheld CS, Maffei L (2003) Provision of brain-derived neurotrophic factor via anterograde transport from the eye preserves the physiological responses of axotomized geniculate neurons. *J Neurosci* 23:287–296.
- Caleo M, Menna E, Chierzi S, Cenni MC, Maffei L (2000) Brain derived neurotrophic factor is an anterograde survival factor in the rat visual system. *Curr Biol* 10:1155–1161.
- Callahan LM, Vaules WA, Coleman PD (1999) Quantitative decrease in synaptophysin message expression and increase in cathepsin D message expression in Alzheimer disease neurons containing neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:275–287.
- Campenot RB (1977) Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:4516–4519.
- Canagarajah BJ, Khokhlatchev A, Cobb MH, Goldsmith EJ (1997) Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90:859–869.
- Caroni P (2001) Actin cytoskeleton regulation through modulation of PI (4,5) P2 rafts. *EMBO J* 20:4332–4336.
- Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhauser N, Bohm-Matthaei R, Baeuerle PA, Barde YA (1996) Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 272:542–545.
- Castren E, Thoenen H, Lindholm D (1995) Brain-derived neurotrophic factor messenger RNA is expressed in the septum, hypothalamus and in adrenergic brain stem nuclei of adult rat brain and is increased by osmotic stimulation in the paraventricular nucleus. *Neuroscience* 64:71–80.
- Castren E, Zafra F, Thoenen H, Lindholm D (1992) Light regulates expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat visual cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9444–9448.
- Cattano D, Young C, Straiko MM, Olney JW (2008) Subanesthetic doses of propofol induce neuroapoptosis in the infant mouse brain. *Anesth Analg* 106:1712–1714.
- Chahal H, D'Souza SW, Barson AJ, Slater P (1998) Modulation by magnesium of N-methyl-D-aspartate receptors in developing human brain. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 78:F116–120.
- Changeux JP, Danchin A (1976) Selective stabilization of developing synapses as a mechanism for specification of neuronal networks. *Nature* 264:705–712.
- Chao MV (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signaling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4:299–309.
- Chao MV, Bothwell M (2002) Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron* 33:9–12.

- Chen X, Kojima S, Borisy GG, Green KJ (2003) p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin–catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol* 163:547–557.
- Chen ZY, Ieraci A, Teng H, Dall H, Meng CX, Herrera DG, Nykjaer A, Hempstead BL, Lee FS (2005) Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J Neurosci* 25:6156–6166.
- Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Taguchi T, Franke TF, Hamilton TC, Tsichlis PN, Testa JR (1992) AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9267–9271.
- Chindewa R, Lapanantasin S, Sanvarinda Y, Chongthammakun S (2007) Genistein Effects On Synaptophysin Expression In Rat Hippocampal Neurons. *Annals of Microscopy* 7:95–101.
- Coffey ET, Akerman KE, Courtney MJ (1997) Brain derived neurotrophic factor induces a rapid upregulation of synaptophysin and tau proteins via the neurotrophin receptor TrkB in rat cerebellar granule cells. *Neurosci Lett* 227:177–180.
- Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci* 17:2295–2313.
- Couchie D, Nunez J (1985) Immunological characterization of microtubule-associated proteins specific for the immature brain. *FEBS Lett* 188:331–335.
- Coulson EJ, Reid K, Baca M, Shipham KA, Hulett SM, Kilpatrick TJ, Bartlett PF (2000) Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J Biol Chem* 275:30537–30545.
- Crosby G, Culley DJ, Patel PM (2010) At the sharp end of spines: anesthetic effects on synaptic remodeling in the developing brain. *Anesthesiology* 112:521–523.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785–789.
- Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, Chen KS, Pitts-Meek S, Armanini MP, Ling LH, McMahon SB, Shelton DL, Levinson AD (1994) Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 76:1001–1011.
- Curtis R, Adryan KM, Stark JL, Park JS, Compton DL, Weskamp G, Huber LJ, Chao MV, Jaenisch R, Lee KF (1995) Differential role of the low affinity neurotrophin receptor (p75) in retrograde axonal transport of the neurotrophins. *Neuron* 14:1201–1211.
- Daly C, Ziff EB (2002) Ca<sup>2+</sup>-dependent formation of a dynamin-synaptophysin complex: potential role in synaptic vesicle endocytosis. *J Biol Chem* 277:9010–9015.
- de Lima AD, Opitz T, Voigt T (2004) Irreversible loss of a subpopulation of cortical interneurons in the absence of glutamatergic network activity. *Eur J Neurosci* 19:2931–2943.
- De Roo M, Klausner P, Briner A, Nikonenko I, Mendez P, Dayer A, Kiss JZ, Muller D, Vutskits L (2009) Anesthetics rapidly promote synaptogenesis during a critical period of brain development. *PLoS ONE* 4:e7043.
- Dechant G, Barde YA (2002) The neurotrophin receptor p75NTR: novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* 5:1131–1136.
- Dekaban AS (1978) Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. *Ann Neurol* 4:345–356.

- Delcroix JD, Valletta JS, Wu C, Hunt SJ, Kowal AS, Mobley WC (2003) NGF signaling in sensory neurons: Evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron* 39:69–84.
- Desborough JP (2000) The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth* 85:109–117.
- Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388:300–304.
- Di Rosa G, Puzzo D, Sant Angelo A, Trinchese F, Arancio O (2003) Alpha-synuclein: between synaptic function and dysfunction. *Histol Histopathol* 18:1257–1266.
- Diamond J, Foerster A, Holmes M, Coughlin M (1992b) Sensory nerves in adult rats regenerate and restore sensory function to the skin independently of endogenous NGF. *J Neurosci* 12, 1467–1476.
- Diamond J, Holmes M, Coughlin M (1992a) Endogenous NGF and nerve impulses regulate the collateral sprouting of sensory axons in the skin of the adult rat. *J Neurosci* 12:1454–1466.
- Dias BG, Banerjee SB, Duman RS, Vaidya VA (2003) Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain. *Neuropharmacology* 45:553–563.
- Diez-Guerra F, Avila J (1993) MAP2 phosphorylation parallels dendrite arborization in hippocampal neurones in culture. *Neuroreport* 4:419–422.
- Dobbing J, Sands J (1979) Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 3:79–83.
- Doble BW, Woodgett JR (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multitasking kinase. *J Cell Sci* 116:1175–1186.
- Dobrowsky RT, Werner MH, Castellino AM, Chao MV, Hannun YA (1994) *Science* 265:1596–1599.
- Dolcet X, Egea J, Soler RM, Martin-Zanca D, Comella JX (1999) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, but not extracellular-regulated kinases, is necessary to mediate brain-derived neurotrophic factor-induced motoneuron survival. *J Neurochem* 73:521–531.
- Donovan SL, Mamounas LA, Andrews AM, Blue ME, McCasland JS (2002) GAP-43 is critical for normal development of the serotonergic innervation in forebrain. *J Neurosci* 22:3543–3552.
- Dummler B, Hemmings BA (2007) Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem Soc Trans* 35:231–235.
- Dunican DJ, Doherty P (2000) The generation of localized calcium rises mediated by cell adhesion molecules and their role in neuronal growth cone motility. *Mol Cell Biol Res Commun* 3:255–263.
- Eastwood SL, Burnet PW, Harrison PJ (1995) Altered synaptophysin expression as a marker of synaptic pathology in schizophrenia. *Neuroscience* 66:309–319.
- Eastwood SL, Burnet PW, McDonald B, Clinton J, Harrison PJ (1994) Synaptophysin gene expression in human brain: a quantitative in situ hybridization and immunocytochemical study. *Neuroscience* 59: 881–892.
- Eckenhoff RG, Johansson JS (1997) Molecular interactions between inhaled anesthetics and proteins. *Pharmacol Rev* 49:343–367.
- Eide FF, Vining ER, Eide BL, Zang K, Wang XY, Reichardt LF (1996) Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 16:3123–3129.



- Engelhard K, Werner C, Eberspacher E, Pape M, Stegemann U, Kellermann K, Hollweck R, Hutzler P, Kochs E (2004) Influence of propofol on neuronal damage and apoptotic factors after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats: a long-term observation. *Anesthesiology* 101:912–917.
- Erhardt P, Schremser EJ, Cooper GM (1999) B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. *Mol Cell Biol* 19:5308–5315.
- Ernfors P, Henschen A, Olson L, Persson H (1989) Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons. *Neuron* 2:1605–1613.
- Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H (1990) Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 5:511–526.
- Eshkind LG, Leube RE (1995) Mice lacking synaptophysin reproduce and form typical synaptic vesicles. *Cell Tissue Res* 282:423–433.
- Fahnestock M, Michalski B, Xu B, Coughlin MD (2001) The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci* 18:210–220.
- Fahnestock M, Yu G, Coughlin MD (2004a) ProNGF: a neurotrophic or an apoptotic molecule? *Prog Brain Res* 146:107–110.
- Fahnestock M, Yu G, Michalski B, Mathew S, Colquhoun A, Ross GM, Coughlin MD (2004b) The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor. *J Neurochem* 89:581–592.
- Fawcett JP, Bamji SX, Causing CG, Aloyz R, Ase AR, Reader TA, McLean JH, Miller FD (1998) Functional evidence that BDNF is an anterograde neuronal trophic factor in the CNS. *J Neurosci* 18:2808–2821.
- Ferhat L, Bernard A, Ribas dPL, Ben AY, Khrestchatisky M (1994) Structure, regional and developmental expression of rat MAP2d, a MAP2 splice variant encoding four microtubule-binding domains. *Neurochem Int* 25:327–338.
- Fischer M, Kaech S, Wagner U, Brinkhaus H, Matus A (2000) Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3:887–894.
- Fiset P, Paus T, Dalozé T, Plourde G, Meuret P, Bonhomme V, Hajj-Ali N, Backman SB, Evans AC (1999) Brain mechanisms of propofol-induced loss of consciousness in humans: a positron emission tomographic study. *J Neurosci* 19:5506–5513.
- Foehr ED, Lin X, O'Mahony A, Gelezianus R, Bradshaw RA and Greene WC (2000) NF-kappa B signaling promotes both cell survival and neurite process formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *J Neurosci* 20:7556–7563.
- Folkerts MM, Berman RF, Muizelaar JP, Rafols JA (1998) Disruption of MAP-2 immunostaining in rat hippocampus after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 15:349–363.
- Fredriksson A, Ponten E, Gordh T, Eriksson P (2007) Neonatal exposure to a combination of N-methyl-D-aspartate and gamma-aminobutyric acid type A receptor anesthetic agents potentiates apoptotic neurodegeneration and persistent behavioral deficits. *Anesthesiology* 107:427–436.
- Freeman RS, Burch RL, Crowder RJ, Lomb DJ, Schoell MC, Straub JA, Xie L (2004) NGF deprivation-induced gene expression: after ten years, where do we stand? *Prog Brain Res* 146:111–126.

- Friedman WJ (2000) Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J Neurosci* 20:6340–6346.
- Fryer RH, Kaplan DR, Feinstein SC, Radeke MJ, Grayson DR, Kromer LF (1996) Developmental and mature expression of full-length and truncated TrkB receptors in the rat forebrain. *J Comp Neurol* 374:21–40.
- Fykse EM, Takei K, Walch-Solimena C, Geppert M, Jahn R, De Camilli P, Sudhof TC (1993) Relative properties and localizations of synaptic vesicle protein isoforms: the case of the synaptophysins. *J Neurosci* 13:4997–5007.
- Galetic I, Maira S, Andjelkovic M, Hemmings BA (2003) Negative regulation of ERK and Elk by protein kinase B modulates c-fos transcription. *J Biol Chem* 278:4416–4423.
- Gartner A, Staiger V (2002) Neurotrophin secretion from hippocampal neurons evoked by long-term-potential-inducing electrical stimulation patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6386–6391.
- Geetha T, Jiang J, Wooten MW (2005) Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell* 20:301–312.
- George JM, Jin H, Woods WS, Clayton DF (1995) Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 15:361–372.
- Ghoneim MM, Block RI (1997) Learning and memory during general anesthesia: an update. *Anesthesiology* 87:387–410.
- Gilman CP, Mattson MP (2002) Do apoptotic mechanisms regulate synaptic plasticity and growth-cone motility? *Neuromolecular Med* 2:197–214.
- Ginty DD, Segal RA (2002) Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. *Curr Opin Neurobiol* 12:268–274.
- Goedert M, Stoeckel K, Otten U (1981) Biological importance of the retrograde axonal transport of nerve growth factor in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:5895–5898.
- Goldberg JL (2003) How does an axon grow? *Genes Develop* 17:941–958.
- Greferath U, Mallard C, Roufail E, Rees SM, Barrett GL, Bartlett PF (2002) Expression of the p75 neurotrophin receptor by striatal cholinergic neurons following global ischemia in rats is associated with neuronal degeneration. *Neurosci Lett* 332:57–60.
- Grell M, Scheurich P, Meager A, Pfizenmaier K (1993) TR60 and TR80 tumor necrosis factor (TNF)-receptors can independently mediate cytolysis. *Lymphokine and Cytokine Res* 12:143–148.
- Grewal SS, York RD, Stork PJS (1999) Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9:544–553.
- Grimes ML, Zhou J, Beattie EC, Yuen EC, Hall DE, Valletta JS, Topp KS, LaVail JH, Bunnett NW, Mobley WC (1996) Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J Neurosci* 16:7950–7964.
- Guitton J, Buronfosse T, Desage M, Flinois JP, Perdrix JP., Brazier JL, Beaune P (1998) Possible involvement of multiple human cytochrome P450 isoforms in the liver metabolism of propofol. *Br J Anaesth* 80:788–795.
- Ha S, Redmond L (2008) ERK mediates activity dependent neuronal complexity via sustained activity and CREB-mediated signaling. *Dev Neurobiol* 68:1565–1579.

- Hales TG, Lambert JJ (1991) The actions of propofol on inhibitory amino acid receptors of bovine adrenomedullary chromaffin cells and rodent central neurones. *Br J Pharmacol* 104:619–628.
- Hanada M, Feng J, Hemmings BA (2004) Structure, regulation and function of PKB/AKT- a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 1697:3–16.
- Harrington AW, Leiner B, Blechschmitt C, Arevalo JC, Lee R, Morl K, Meyer M, Hempstead BL, Yoon SO, Giehl KM (2004) Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6226–6230.
- Hartmann M, Brigadski T, Erdmann KS, Holtmann B, Sendtner M, Narz F, Lessmann V (2004) Truncated TrkB receptor-induced outgrowth of dendritic filopodia involves the p75 neurotrophin receptor. *J Cell Sci* 117:5803–5814.
- Hartmann M, Heumann R, Lessmann V (2001) Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J* 20:5887–5897.
- Hatano N, Mori Y, Oh-hora M, Kosugi A, Fujikawa T, Nakai N, Niwa H, Miyazaki J, Hamaoka T, Ogata M. (2003) Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells* 8:847–856.
- Hatta K, Takagi S, Fujisawa H, Takeichi M (1987) Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev Biol* 120:215–227.
- Hayashi K, Ishikawa R, Ye LH, Takata K, Kohama K, Shirao T (1996) Modulatory role of drebrin in the cytoskeleton within dendritic spines in the rat cerebral cortex. *J Neurosci* 16:7161–7170.
- He Q, Dent EW, Meiri KF (1997) Modulation of actin filament behavior by GAP-43 (neuromodulin) is dependent on the phosphorylation status of serine 41, the protein kinase C site. *J. Neurosci* 17:3515–3524.
- Head BP, Patel HH, Niesman IR, Drummond JC, Roth DM, Patel PM (2009) Inhibition of p75 neurotrophin receptor attenuates isoflurane-mediated neuronal apoptosis in the neonatal central nervous system. *Anesthesiology* 110:813–825.
- Hebb DO (1949) *The Organization of Behaviour*. Wiley, New York.
- Hemmings HC, Akabas MH, Goldstein PA, Trudell JR, Orser BA, Harrison NL (2005) Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action. *TRENDS in Pharmacol Sci* 26:503–510.
- Hempstead BL, Rabin SJ, Kaplan L, Reid S, Parada LF, Kaplan DR (1992) Overexpression of the trk tyrosine kinase rapidly accelerates nerve growth factor-induced differentiation. *Neuron* 9:883–896.
- Hicks RR, Smith DH, McIntosh TK (1995) Temporal response and effects of excitatory amino acid antagonism on microtubule-associated protein 2 immunoreactivity following experimental brain injury in rats. *Brain Res* 678:151–160.
- Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/ brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344:339–341.
- Holtmaat A, Svoboda K (2009) Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci* 10:647–658.
- Honegger P, Matthieu JM (1996) Selective toxicity of the general anesthetic propofol for GABAergic neurons in rat brain cell cultures. *J Neurosci Res* 45:631–636.

- Honjo Y, Nakagawa S, Takeichi M (2000) Blockade of cadherin-6B activity perturbs the distribution of PSD-95 family proteins in retinal neurones. *Genes Cells* 5:309–318.
- Horch HW, Katz LC (2002) BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat Neurosci* 5:1177–1184.
- Hsu LJ, Mallory M, Xia Y, Veinbergs I, Hashimoto M, Yoshimoto M, Thal LJ, Saitoh T, Masliah E (1998) Expression pattern of synucleins (non-Abeta component of Alzheimer's disease amyloid precursor protein/alpha-synuclein) during murine brain development. *J Neurochem* 71:338–344.
- Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677–736.
- Ikonomidou C, Bittigau P, Koch C, Genz K, Hoerster F, Felderhoff-Mueser U, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW (2001) Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol* 62:401–405.
- Ishibashi H (2002) Increased synaptophysin expression through whisker stimulation in rat. *Cell Mol Neurobiol* 22:191–195.
- Ishizawa Y (2007) Mechanisms of anesthetic actions and the brain. *J Anesth* 21:187–199.
- Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, de Silva HA, Kittel A, Saitoh T (1995) The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14:467–475.
- Jacobsen JP, Mork A (2004) The effect of escitalopram, desipramine, electroconvulsive seizures and lithium on brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the rat brain and the correlation to 5-HT and 5-HIAA levels. *Brain Res* 1024:183–192.
- Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, Greengard P (1985) A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4137–4141.
- Janz R, Sudhof TC, Hammer RE, Unni V, Siegelbaum SA, Bolshakov VY (1999) Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron* 24:687–700.
- Jensen AG, Lindroth M, Sjolander A, Eintrei C (1994) Propofol induces changes in the cytosolic free calcium concentration and the cytoskeletal organization of cultured human glial cells and primary embryonic rat brain cells. *Anesthesiology* 81:1220–1229.
- Jevtovic-Todorovic V (2005) General anesthetics and the developing brain: friends or foes? *J Neurosurg Anesthesiol* 17:204–206.
- Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, Olney J, Wozniak DF (2003) Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci* 23:876–882.
- Ji Y, Lu Y, Yang F, Shen W, Tang TT, Feng L, Duan S, Lu B (2010) Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons. *Nat Neurosci* 13:302–309.
- Jia Y, Zhou J, Tai Y, Wang Y (2007) TRPC channels promote cerebellar granule neuron survival. *Nat Neurosci* 10:559–567.
- Jin M, Tanaka S, Sekino Y, Ren Y, Yamazaki H, Kawai-Hirai R, Kojima N, Shirao T (2002) A novel, brain-specific mouse drebrin: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic structure, expression, and functional characterization. *Genomics* 79:686–692.

- John ER, Prichep LS (2005) The anesthetic cascade: a theory of how anesthesia suppresses consciousness. *Anesthesiology* 102:447–471.
- John GR, Lee SC, Brosnan CF (2003) Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist* 9:10–22.
- Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, Chao M (1986) Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47:545–554.
- Johnson GV, Jope RS (1992) The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *J Neurosci Res* 33:505–512.
- Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, Maurer F, Hemmings BA (1991) Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4171–4175.
- Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (1994) Constitutive NF-kappa B activity in neurons. *Mol Cell Biol* 14:3981–3992.
- Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A (1999) Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 9:601–604.
- Kang H, Schuman EM (1995) Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 267:1658–1662.
- Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10:381–391.
- Karin M, Lin A (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3:221–227.
- Kawaguchi M, Kimbro JR, Drummond JC, Cole DJ, Kelly PJ, Patel PM (2000) Isoflurane delays but does not prevent cerebral infarction in rats subjected of focal ischemia. *Anesthesiology* 92:1335–1342.
- Kay B, Rolly G (1977) I.C.I. 35868, a new intravenous induction agent. *Acta Anaesthesiol Belg* 28:303–316.
- Keita H, Lecharny JB, Henzel D, Desmots JM, Mantz J (1996) Is inhibition of dopamine uptake relevant to the hypnotic action of i.v. anaesthetics? *Br J Anaesth* 77:254–256.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239–257.
- Kerssens C, Ouchi T, Sebel PS (2005) No evidence of memory function during anesthesia with propofol or isoflurane with close control of hypnotic state. *Anesthesiology* 102:57–62.
- Kidambi S, Yarmush J, Berdichevsky Y, Kamath S, Fong W, Schianodicola J (2010) Propofol induces MAPK/ERK cascade dependant expression of cFos and Egr-1 in rat hippocampal slices. *BMC Res Notes* 3: 201.
- Kingston S, Mao L, Yang L, Arora A, Fibuch EE, Wang JQ (2006) Propofol inhibits phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunits in neurons. *Anesthesiology* 104:763–769.
- Kintner C (1992) Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain. *Cell* 69:225–236.
- Knaus P, Marqueze-Pouey B, Scherer H, Betz H (1990) Synaptoporin, a novel putative channel protein of synaptic vesicles. *Neuron* 5:453–462.

- Knott GW, Holtmaat A, Wilbrecht L, Welker E, Svoboda K (2006) Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat Neurosci* 9:1117–1124.
- Kobayashi RY, Sekino, Shirao T, Tanaka S, Ogura T, Inada K, Saji M (2004) Antisense knockdown of drebrin A, a dendritic spine protein, causes stronger preference, impaired prepulse inhibition, and an increased sensitivity to psychostimulant. *Neurosci Res* 49:205–217.
- Kohara K, Kitamura A, Morishima M, Tsumoto T (2001) Activity dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science* 291:2419–2423.
- Kokaia M, Ernfors P, Kokaia Z, Elmér E, Jaenisch R, Lindvall O (1995) Suppressed epileptogenesis in BDNF mutant mice. *Exp Neurol* 133:215–224.
- Kokaia Z, Bengzon J, Metsis M, Kokaia M, Persson H, Lindvall O (1993) Coexpression of neurotrophins and their receptors in neurons of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6711–6715.
- Konishi H, Kuroda S, Tanaka M, Matsuzaki H, Ono Y, Kameyama K, Haga T, Kikkawa U (1995) Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of three types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 216:526–534.
- Korsching S, Auburger G, Heumann R, Scott J, Thoenen H (1985) Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. *Embo J* 4:1389–1393.
- Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8856–8860.
- Kozinn J, Mao L, Arora A, Yang L, Fibuch EE, Wang JQ (2006) Inhibition of glutamatergic activation of extracellular signal-regulated protein kinases in hippocampal neurons by the intravenous anesthetic propofol. *Anesthesiology* 105:1182–1191.
- Krasowski MD, Harrison NL (1999) General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. *Cell Mol Life Sci* 55:1278–1303.
- Krasowski MD, Koltchine VV, Rick CE, Ye Q, Finn SE, Harrison NL (1998) Propofol and other intravenous anesthetics have sites of action on the gamma-aminobutyric acid type A receptor distinct from that for isoflurane. *Mol Pharmacol* 53:530–538.
- Kruger L, Bendotti C, Rivolta R, Samanin R (1993) Distribution of GAP-43 mRNA in the adult rat brain. *J Comp Neurol* 333:417–434.
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384:368–372.
- Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, Avruch J (1992) Raf-1 activates MAPKK. *Nature* 358:417–421.
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369:156–160.
- Kyriakis JM, Force TL, Rapp UR, Bonventre JV, Avruch J (1993) Mitogen regulation of c- Raf-1 protein kinase activity toward mitogen-activated protein kinase-kinase. *J Biol Chem* 268:16009–16019.

- Large TH, Bodary SC, Clegg DO, Weskamp G, Otten U, Reichardt LF (1986) Nerve growth factor gene expression in the developing rat brain. *Science* 234:352–355.
- Leclerc N, Beesley PW, Brown I, Colonnier M, Gurd JW, Paladino T, Hawkes R (1989) Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex. *J comp Neurol* 280:197–212.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372:739–746.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294:1945–1948.
- Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P (2008) Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Mol Cell Biol* 28:511–527.
- Lessmann V, Gottmann K, Malsangio M (2003) Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol* 69:341–374.
- Levi-Montalcini R (1987) Nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1154–1161.
- Levi-Montalcini R, Angeletti PU (1968) Nerve growth factor. *Physiol Rev* 48:534–569.
- Levi-Montalcini R, Hamburger V (1951) Selective growth-stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* 116:321–361.
- Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L, Leon A (1996) Nerve growth factor: From neurotrophin to neurokinin. *Trends Neurosci* 19:514–520.
- Liao Y, Hung MC (2010) Physiological regulation of Akt activity and stability. *Am J Transl Res* 2:19–42.
- Lindholm D, Castren E, Berzaghi M, Blochl A, Thoenen H (1994) Activity-dependent and hormonal regulation of neurotrophin mRNA levels in the brain—implications for neuronal plasticity. *J Neurobiol* 25:1362–1372.
- Lindsay RM (1988) Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons. *J Neurosci* 8:2394–2405.
- Linnarsson S, Bjorklund A, Ernfors P (1997) Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci* 9:2581–2587.
- Lippman J, Dunaevsky A (2005) Dendritic spine morphogenesis and plasticity. *J Neurobiol* 64:47–57.
- Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG (1996) Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379:349–353.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T) (−delta delta C) method. *Methods* 25:402–408.
- Lo DC (1995) Neurotrophic factors and synaptic plasticity. *Neuron* 15:979–981.
- Lobos E, Gebhardt C, Kluge A, Spanel-Borowski K (2005) Expression of nerve growth factor (NGF) isoforms in the rat uterus during pregnancy: accumulation of precursor proNGF. *Endocrinology* 146:1922–1929.
- Loepke AW, Soriano SG (2008) An Assessment of the Effects of General Anesthetics on Developing Brain Structure and Neurocognitive Function. *Anesth Analg* 106:1681–707.

- Lohof AM, Ip NY, Poo MM (1993) Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature* 363:350–353.
- Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM (1999) RING fingers mediate ubiquitinconjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11364–11369.
- Lou H, Kim SK, Zaitsev E, Snell CR, Lu B, Loh YP (2005) Sorting and activity-dependent secretion of BDNF require interaction of a specific motif with the sorting receptor carboxypeptidase E. *Neuron* 45:245–255.
- Lu B, Pang PT, Woo NH (2005) The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6: 603–614.
- Lu LX, Yon JH, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V (2006) General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain. *Apoptosis* 11:1603–1615.
- Lu S, Lu C, Han Q, Li J, Du Z, Liao L, Zhao RC (2011) Adipose-derived mesenchymal stem cells protect PC12 cells from glutamate excitotoxicity-induced apoptosis by upregulation of XIAP through PI3-K/Akt activation. *Toxicology* 279:189–195.
- Lu Z, Xu S (2006) ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life* 58:621–631.
- Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA, Coppola V, Reid SW, Bora SH, Wihler C, Koliatsos VE, Tessarollo L (1999) Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:15239–15244.
- Mabuchi S, Ohmichi M, Kimura A, Hisamoto K, Hayakawa J, Nishio Y, Adachi K, Takahashi K, Arimoto-Ishida E, Nakatsuji Y, Tasaka K, Murata Y (2002) Inhibition of phosphorylation of BAD and Raf-1 by Akt sensitizes human ovarian cancer cells to paclitaxel. *J Biol Chem* 277:33490–33500.
- MacEwan DJ (2002) TNF ligands and receptors - a matter of life and death. *Br J Pharmacol* 135:855–875.
- Macias M, Dwornik A, Ziemińska E, Fehr S, Schachner M, Czarkowska-Bauch J, Skup M (2007) Locomotor exercise alters expression of pro-brain-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB in the spinal cord of adult rats. *Eur J Neurosci* 25:2425–2444.
- Majoul I, Shirao T, Sekino Y, Duden R (2007) Many faces of drebrin: from building dendritic spines and stabilizing gap junctions to shaping neurite-like cell processes. *Histochem Cell Biol* 127:355–361.
- Makkerh JP, Ceni C, Auld DS, Vaillancourt F, Dorval G, Barker PA (2005) p75 neurotrophin receptor reduces ligand-induced Trk receptor ubiquitination and delays Trk receptor internalization and degradation. *EMBO Rep* 6:936–941.
- Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D (1997) MAP3K-related kinase involved in NFκB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385:540–544.
- Marshall CJ (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179–185.
- Martin SJ, Green DR (1995) Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82:349–352.
- Martin-Zanca D, Oskam R, Mitra G, Copeland T, Barbacid M (1989) Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol Cell Biol* 9:24–33.



- Mascia MP, Machu TK, Harris RA (1996) Enhancement of homomeric glycine receptor function by long-chain alcohols and anaesthetics. *Br J Pharmacol* 119:1331–1336.
- Matsunaga M, Hatta K, Nagafuchi A, Takeichi M (1988) Guidance of optic nerve fibres by N-cadherin adhesion molecules. *Nature* 334:62–64.
- Mattson MP, Meffert MK (2006) Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ* 13:852–860.
- May MJ, Ghosh S (1999) IkappaB kinases: kinsmen with different crafts. *Science* 284:271–273.
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC (1997) Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth. *Neuron* 18:767–778.
- McDonald JW, Silverstein FS, Johnston MV (1988) Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res* 459:200–203.
- Mebratu Y, Tesfaigzi Y (2009) How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 8:1168–1175.
- Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D (2003) NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci* 6:1072–1078.
- Meier R, Alessi DR, Cron P, Andjelkovic M, Hemmings BA (1997) Mitogenic Activation, Phosphorylation, and Nuclear Translocation of Protein Kinase B $\beta$ . *Journal of Biol Chem* 272:30491–30497.
- Meiri KF, Saffell JL, Walsh FS, Doherty P (1998) Neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion molecules requires growth-associated protein-43 (GAP-43) function and is associated with GAP-43 phosphorylation in growth cones. *J Neurosci* 18:10429–10437.
- Milanovic D, Popic J, Pesic V, Loncarevic-Vasiljkovic N, Kanazir S, Jevtovic-Todorovic V, Ruzdijic S (2010) Regional and temporal profiles of calpain and caspase-3 activities in postnatal rat brain following repeated propofol administration. *Dev Neurosci* 32:288–301.
- Miller FD, Kaplan DR (2001) On Trk for retrograde signaling. *Neuron* 32:767–770.
- Minichiello L, Calella AM, Medina DL, Bonhoeffer T, Klein R, Korte M (2002) Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 36:121–137.
- Mizui T, Takahashi H, Sekino Y, Shirao T (2005) Overexpression of drebrin A in immature neurons induces the accumulation of F-actin and PSD-95 into dendritic filopodia, and the formation of large abnormal protrusions. *Mol Cell Neurosci* 30:149–157.
- Mody I, Pearce RA (2004) Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends Neurosci* 27:569–575.
- Motsch J, Roggenbach J (2004) Propofol infusion syndrome. *Anaesthesist* 53:1009–1022.
- Muller DL, Unterwald EM (2004) In Vivo Regulation of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase (ERK) and Protein Kinase B (Akt) Phosphorylation by Acute and Chronic Morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 310: 774–782.
- Muragaki Y, Timothy N, Leight S, Hempstead BL, Chao MV, Trojanowski JQ, Lee VM (1995) Expression of trk receptors in the developing and adult human central and peripheral nervous system. *J Comp Neurol* 356:387–397.

- Murase S, Schuman EM (1999) The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Cell Biol* 11:549–553.
- Murphy DD, Cole NB, Segal M (1998) Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11412–11417.
- Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VM (2000) Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci* 20:3214–3220.
- Musazzi L, Cattaneo A, Tardito D, Barbon A, Gennarelli M, Barlati S, Racagni G, Popoli M (2009) Early raise of BDNF in hippocampus suggests induction of posttranscriptional mechanisms by antidepressants. *BMC Neurosci* 10:48.
- Nakao S, Nagata A, Miyamoto E, Masuzawa M, Murayama T, Shingu K (2003) Inhibitory effect of propofol on ketamine-induced c-Fos expression in the rat posterior cingulate and retrosplenial cortices is mediated by GABAA receptor activation. *Acta Anaesthesiol Scand* 47:284–290.
- Natoli G, Costanzo A, Guido F, Moretti F, Levrero M (1998) Apoptotic, non-apoptotic, and anti-apoptotic pathways of tumor necrosis factor signalling. *Biochem Pharmacol* 56:915–920.
- Neet KE, Campenot RB (2001) Receptor binding, internalization, and retrograde transport of neurotrophic factors. *Cell Mol Life Sci* 58:1021–1035.
- Nguyen TT, Scimeca JC, Filloux C, Peraldi P, Carpentier JL, Van Obberghen E (1993) Co-regulation of the mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1, and the 90-kDa ribosomal S6 kinase in PC12 cells. Distinct effects of the neurotrophic factor, nerve growth factor, and the mitogenic factor, epidermal growth factor. *J Biol Chem* 268:9803–9810.
- NicAmhlaoih R, Heenan M, Cleary I, Touhey S, O’Loughlin C, Daly C, Nunez G, Scanlon KJ, Clynes M (1999) Altered expression of mRNAs for apoptosismodulating proteins in a low level multidrug resistant variant of a human lung carcinoma cell line that also expresses mdrl mRNA. *Int J Cancer* 82:368–376.
- Nicholson KM, Anderson NG (2002) The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14:381–395.
- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64:313–353.
- Norberg J, Zimmer J (1998) Ethanol induces MAP2 changes in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuroreport* 9:3177–3182.
- Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17:3237–3245.
- Okuda T, Yu LM, Cingolani LA, Kemler R, Goda Y (2007) beta-Catenin regulates excitatory postsynaptic strength at hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13479–13484.
- Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14:453–501.
- Oray S, Majewska A, Sur M (2006) Effects of synaptic activity on dendritic spine motility of developing cortical layer v pyramidal neurons. *Cereb Cortex* 16:730–741.
- Orser BA, Bertlik M, Wang LY, MacDonald JF (1995) Inhibition by propofol (2,6 di-isopropylphenol) of the N-methyl-D-aspartate subtype of glutamate receptor in cultured hippocampal neurones. *Br J Pharmacol* 116:1761–1768.

- Ortiz J, Harris HW, Guitart X, Terwilliger RZ, Haycock JW, and Nestler EJ (1995) Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain: regional distribution and regulation by chronic morphine. *J Neurosci* 15:1285–1297.
- Oscarsson A, Juhas M, Sjolander A, Eintrei C (2007) The effect of propofol on actin, ERK-1/2 and GABAA receptor content in neurones. *Acta Anaesthesiol Scand* 51:1184–1189.
- Ostrerova N, Petrucelli L, Farrer M, Mehta N, Choi P, Hardy J, Wolozin B (1999)  $\alpha$ -Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J Neurosci* 19:5782–5791.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB (1999) NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401:82–85.
- Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auberger P, Pouyssegur J (1999) Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286:1374–1377.
- Pahl HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18:6853–6866.
- Pain L, Gobaille S, Schleeff C, Aunis D, Oberling P (2002) In vivo dopamine measurements in the nucleus accumbens after nonanesthetic and anesthetic doses of propofol in rats. *Anesth Analg* 95:915–919.
- Pandey A, Mann M (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405:837–846.
- Parke TJ, Stevens JE, Rice AS, Greenaway CL, Bray RJ, Smith PJ, Waldmann CS, Verghese C (1992) Metabolic acidosis and fatal myocardial failure after propofol infusion in children: five case reports. *BMJ* 305:613–616.
- Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER (1996) Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16:1137–1145.
- Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* 10:885–892.
- Pereira DB, Chao MV (2007) The tyrosine kinase Fyn determines the localization of TrkB receptors in lipid rafts. *J Neurosci* 27:4859–4869.
- Perez J, Tinelli D, Brunello N, Racagni G (1989) cAMP-dependent phosphorylation of soluble and crude microtubule fractions of rat cerebral cortex after prolonged desmethylimipramine treatment. *Eur J Pharmacol* 172:305–316.
- Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ (2002) A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci* 22:3090–3099.
- Perrone-Bizzozero NI, Neve RL, Irwin N, Lewis S, Fischer I, Benowitz LI (1991) Post-transcriptional regulation of GAP-43 mRNA levels during neuronal differentiation and nerve regeneration. *Mol Cell Neurosci* 2:402–409.
- Pešić V, Milanović D, Tanić N, Popić J, Kanazir S, Jevtović-Todorović V, Ruzdijić S (2009) Potential mechanism of cell death in the developing rat brain induced by propofol anesthesia. *Int J Dev Neurosci* 27:279–287.
- Petersen K, Olesen OF, Mikkelsen JD (1999) Developmental expression of alpha-synuclein in rat hippocampus and cerebral cortex. *Neuroscience* 91:651–659.

- Pierotti MA, Greco A (2006) Oncogenic rearrangements of the NTRK1/NGF receptor. *Cancer Lett* 232:90-98.
- Planel E, Richter KE, Nolan CE, Finley JE, Liu L, Wen Y, Krishnamurthy P, Herman M, Wang L, Schachter JB, Nelson RB, Lau LF, Duff KE (2007) Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J Neurosci* 27:3090-3097.
- Plow EF, Herren T, Redlitz A, Miles LA, Hoover-Plow JL (1995) The cell biology of the plasminogen system. *FASEB J* 9:939-945.
- Ponten E, Fredriksson A, Gordh T, Eriksson P, Viberg H (2011) Neonatal exposure to propofol affects BDNF but not CaMKII, GAP-43, synaptophysin and tau in the neonatal brain and causes an altered behavioural response to diazepam in the adult mouse brain. *Behav Brain Res* 223:75-80.
- Poo MM (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2:24-32.
- Qiu MS, Green SH (1992) PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity. *Neuron* 9:705-717.
- Quartu M, Serra MP, Manca A, Follesa P, Lai ML, Del Fiacco M (2003) Neurotrophin-like Immunoreactivity in the human pre-term newborn, infant, and adult cerebellum. *Int J Dev Neurosci* 21:23-33.
- Rajagopal R, Chen ZY, Lee FS, Chao MV (2004) Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes. *J Neurosci* 24:6650-6658.
- Rakic S, Zecevic N (2000) Programmed cell death in the developing human telencephalon. *Eur J Neurosci* 12:2721-2734.
- Raley-Susman K, Murata K (1995) Time course of protein changes following in vitro ischemia in the rat hippocampal slice. *Brain Res* 694:94-102.
- Rampil IJ, Laster MJ (1992) No correlation between quantitative electroencephalographic measurements and movement response to noxious stimuli during isoflurane anesthesia in rats. *Anesthesiology* 77:920-925.
- Rao H, Jean A, Kessler JP (1997) Postnatal ontogeny of glutamate receptors in the rat nucleus tractus solitarius and ventrolateral medulla. *J Auton Nerv Syst* 65:25-32.
- Reichardt LF (2003) Neurobiology: signals that make waves. *Nature* 426:25-26.
- Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1545-1564.
- Riccio A, Pierchala BA, Ciarallo CL, Ginty DD (1997) An NGF-TrkA mediated retrograde signal to transcription factor CREB in sympathetic neurons. *Science* 277:1097-1100.
- Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS (2001) Structural Basis for the Inhibition of Caspase-3 by XIAP. *Cell* 104:791-800.
- Ringstedt T, Lagercrantz H, Persson H (1993) Expression of members of the trk family in the developing postnatal rat brain. *Dev Brain Res* 72:119-131.
- Rocamora N, Welker E, Pascual M, Soriano E (1996) Upregulation of BDNF mRNA expression in the barrel cortex of adult mice after sensory stimulation. *J Neurosci* 16:4411-4419.
- Romashkova JA, Makarov SS (1999) NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401:86-90.

- Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nuñez L, Rossman R, Reid K, Moelling K, Yancopoulos GD, Glass DJ (1999) Differentiation Stage-Specific Inhibition of the Raf-MEK-ERK Pathway by Akt. *Science* 286:1738–1741.
- Rose CR, Blum R, Pichler B, Lepier A, Kafitz KW, Konnerth A (2003) Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* 426:74–78.
- Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV (1995) TRAF2- mediated activation of NFκB by TNF-receptor 2 and CD40. *Science* 269:1424–1427.
- Roussin A, Mirepoix M, Lassabe G, Dumestre-Toulet V, Gardette V, Montastruc JL, Lapeyre-Mestre M (2006) Death related to a recreational abuse of propofol at therapeutic dose range. *Br J Anaesth* 97:268.
- Roux PP, Bhakar AL, Kennedy TE, Barker PA (2001) The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 276:23097–23104.
- Roux PP, Colicos MA, Barker PA, Kennedy TE (1999) p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure. *J Neurosci* 19:6887–6896.
- Roy AW (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* 5:483–494.
- Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997) The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 16:6914–6925.
- Salinas PC, Price SR (2005) Cadherins and catenins in synapse development. *Curr Opin Neurobiol* 15:73–80.
- Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J (2000) Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* 61:133–168.
- Sano K, Nanba H, Tabuchi A, Tsuchiya T, Tsuda M (1996) BDNF gene can be activated by Ca<sup>2+</sup> signals without involvement of de novo AP-1 synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 229:788–793.
- Santi S, Cappello S, Riccio M, Bergami M, Aicardi G, Schenk U, Matteoli M, Canossa M (2006) Hippocampal neurons recycle BDNF for activity-dependent secretion and LTP maintenance. *EMBO J* 25:4372–4380.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor–mTOR complex. *Science* 307:1098–1101.
- Satomoto M, Satoh Y, Terui K, Miyao H, Takishima K, Ito M, Imaki J (2009) Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. *Anesthesiology* 110:628–637.
- Sawada M, Kondo N, Suzumura A, Marunouchi T (1989) Production of TNF-α by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res* 491:394–397.
- Schecterson LC, Bothwell M (2010) Neurotrophin receptors: Old friends with new partners. *Dev Neurobiol* 70:332–338.
- Scheiffele P (2003) Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 26:485–508.
- Schinder AF, Poo M (2000) The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 23:639–645.

- 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.
- Schulte D, Callado LF, Davidson C, Phillips PE, Roewer N, Schulte am Esch J, Stamford JA (2000) Propofol decreases stimulated dopamine release in the rat nucleus accumbens by a mechanism independent of dopamine D2, GABAA and NMDA receptors. *Br J Anaesth* 84:250–253.
- Schweigreiter R (2006) The dual nature of neurotrophins. *Bioessays* 28:583–594.
- Segal RA, Greenberg ME (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* 19:463–489.
- Seger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9:726–735.
- Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberte J, Lazure C, Chretien M, Murphy RA (1996) Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* 314:951–960.
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA (2004) Tonically active GABAA receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci* 27:262–269.
- Shen Y, Mani S, Donovan SL, Schwob JE, Meiri KF (2002) Growth-associated protein-43 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *J Neurosci* 22:239–247.
- Shim KS, Lubec G (2002) Drebrin, a dendritic spine protein, is manifold decreased in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neurosci Lett* 324:209–212.
- Shirao T, Kojima N, Kato Y, Obata K (1988) Molecular cloning of a cDNA for the developmentally regulated brain protein, drebrin. *Brain Res* 464:71–74.
- Skene JH, Willard M (1981) Characteristics of growth-associated polypeptides in regenerating toad retinal ganglion cell axons. *J Neurosci* 1:419–426.
- Smeyne RJ, Klein R, Schnapp A, Long LK, Bryant S, Lewin A, Lira SA, Barbacid M (1994) Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* 368:246–249.
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation and death. *Cell* 76:959–962.
- Sonner JM, Zhang Y, Stabernack C, Abaigar W, Xing Y, Laster MJ (2003) GABA(A) receptor blockade antagonizes the immobilizing action of propofol but not ketamine or isoflurane in a dose-related manner. *Anesth Analg* 96:706–712.
- Spahr-Schopfer I, Vutskits L, Toni N, Buchs PA, Parisi L, Muller D (2000) Differential neurotoxic effects of propofol on dissociated cortical cells and organotypic hippocampal cultures. *Anesthesiology* 92:1408–1417.
- Squire LR (2004) Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82:171–177.
- Staal SP, Hartley JW, Rowe WP (1977) Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:3065–3067.

- Stennicke HR, Salvesen GS (1998). Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* 1387:17–31.
- Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, McCormick F, Tempst P, Coadwell J, Hawkins PT (1998) Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279:710–714.
- Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, Hawkins PT (1997) Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277:567–570.
- Stratmann G, Sall JW, May LD, Bell JS, Magnusson KR, Rau V, Visrodia KH, Alvi RS, Ku B, Lee MT, Dai R (2009) Isoflurane differentially affects neurogenesis and long-term neurocognitive function in 60-day-old and 7-day-old rats. *Anesthesiology* 110:834–848.
- Strittmatter SM, Cannon SC, Ross EM, Higashijima T, Fishman MC (1993) GAP-43 augments G-protein-coupled receptor transduction in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5327–5331.
- Strittmatter SM, Fankhauser C, Huang PL, Mashimo H, Fishman MC (1995) Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking the neuronal growth cone protein GAP-43. *Cell* 80:445–452.
- Surguchov A, Palazzo RE, Surgucheva I (2001) Gamma synuclein: subcellular localization in neuronal and non-neuronal cells and effect on signal transduction. *Cell Motil Cytoskeleton* 49:218–228.
- Takahashi H, Mizui T, Shirao T (2006) Down-regulation of drebrin A expression suppresses synaptic targeting of NMDA receptors in developing hippocampal neurons. *J Neurochem* 97:110–115.
- Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brugger B, Ringle P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127:831–846.
- Takamura H, Ichisaka S, Watanabe K, Toigawa M, Hata Y (2008) Effects of anesthesia on immunohistochemical detection of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase in cerebral cortex. *J Neurosci Methods* 170:300–304.
- Takei N, Inamura N, Kawamura M, Namba H, Hara K, Yonezawa K, Nawa H (2004) Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *J Neurosci* 24:9760–9769.
- Takei N, Kawamura M, Hara K, Yonezawa K, Nawa H (2001) Brain derived neurotrophic factor enhances neuronal translation by activating multiple initiation processes: comparison with the effects of insulin. *J Biol Chem* 276:42818–42825.
- Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC (1998) IAP-family protein survivin inhibits caspases activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 58:5315–5320.
- Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME (1998) Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20:709–726.
- Tarlow MJ, Jenkins R, Comist SD, Osborne MP, Stephens S, Stanley P, Crokers J (1993) Ependymal cells of the choroid plexus express tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Neuropathol Appl Neurobiol* 19:324–328.
- Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74:845–853.

- Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Pallachino MA, Jr, Goeddel DV (1991) The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9292–9295.
- Teng KK, Hempstead BL (2004) Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell Mol Life Sci* 61:35–48.
- Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, Huttner WB (2000) Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol* 2:42–49.
- Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456–1462.
- Thompson KA, Goodale DB (2000) The recent development of propofol (DIPRIVAN). *Intensive Care Med* 26(suppl 4):S400–404.
- Togashi H, Abe K, Mizoguchi A, Takaoka K, Chisaka O, Takeichi M (2002) Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron* 35:77–89.
- Tomlin SL, Jenkins A, Lieb WR, Franks NP (1998) Stereoselective effects of etomidate optical isomers on gamma-aminobutyric acid type A receptors and animals. *Anesthesiology* 88:708–717.
- Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, Svoboda K (2002) Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420:788–794.
- Tran SE, Holmstrom TH, Ahonen M, Kahari VM, Eriksson JE (2001) MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J Biol Chem* 276:16484–16490.
- Tria MA, Fusco M, Vantini G, Mariot R (1994) Pharmacokinetics of nerve growth factor (NGF) following different routes of administration to adult rats. *Exp Neurol* 127:178–183.
- Trudell JR, Harris RA (2004) Are sobriety and consciousness determined by water in protein cavities? *Alcohol Clin Exp Res* 28:1–3.
- Tsui-Pierchala BA, Ginty DD (1999) Characterization of an NGF–P-TrkA retrograde-signaling complex and age- dependent regulation of TrkA phosphorylation in sympathetic neurons. *J Neurosci* 19:8207–8218.
- Tuma R, Russell M, Rosendahl M, Thomas GJ Jr (1995) Solution conformation of the extracellular domain of the human tumor necrosis factor receptor probed by Raman and UV-resonance Raman spectroscopy: structural effects of an engineered PEG linker. *Biochemistry* 34:15150–15156.
- Turina D, Loitto VM, Bjornstrom K, Sundqvist T, Eintrei C (2008) Propofol causes neurite retraction in neurons. *Br J Anesth* 101:374–379.
- Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DAC, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T (1993) Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc natn Acad Sci USA* 90:11282–11286.
- Urban BW (2002) Current assessment of targets and theories of anaesthesia. *Br J Anaesth* 89:167–183.
- Valdez G, Akmentin W, Philippidou P, Kuruvilla R, Ginty DD, Halegoua S (2005) Pincher-mediated macroendocytosis underlies retrograde signaling by neurotrophin receptors. *J Neurosci* 25:5236–5247.
- Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W (1995) Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 5:392–399.



- Varju P, Katarova Z, Madarasz E, Szabo G (2001) GABA signalling during development: new data and old questions. *Cell Tissue Res* 305:239–246.
- Volosin M, Song W, Almeida RD, Kaplan DR, Hempstead BL, Friedman WJ (2006) Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins. *J Neurosci* 26:7756–7766.
- von Bartheld CS, Byers MR, Williams R, Bothwell M (1996) Anterograde transport of neurotrophins and axodendritic transfer in the developing visual system. *Nature* 379:830–833.
- Vutskits L, Gascon E, Tassonyi E, Kiss JZ (2005) Clinically relevant concentrations of propofol but not midazolam alter in vitro dendritic development of isolated gamma-aminobutyric acid-positive interneurons. *Anesthesiology* 102:970–976.
- Wang C, Shimizu-Okabe C, Watanabe K, Okabe A, Matsuzaki H, Ogawa T, Mori N, Fukuda A, Sato K (2002) Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 139:59–66.
- Wang X, Zhu C, Wang X, Hagberg H, Korhonen L, Sandberg M, Lindholm D, Blomgren K (2004) X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) protein protects against caspase activation and tissue loss after neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol Dis* 16:179–189.
- Watson FL, Heerssen HM, Moheban DB, Lin MZ, Sauvageot CM, Bhattacharyya A, Pomeroy SL, Segal RA (1999) Rapid nuclear responses to target-derived neurotrophins require retrograde transport of ligand-receptor complex. *J Neurosci* 19:7887–7900.
- Watson FL, Porcionatto MA, Bhattacharyya A, Stiles CD, Segal RA (1999) TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J Neurobiol* 39:323–336.
- West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME (2001) Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11024–11031.
- Wiche G (1989) High-Mr microtubule-associated proteins: properties and functions. *Biochem J* 259:1–12.
- Wiche G, Oberkanins C, Himmler A (1991) Molecular structure and function of microtubule-associated proteins. *Int Rev Cytol* 124:217–273.
- Williams DB, Akabas MH (1999) GABA increases the water accessibility of M3 membrane-spanning residues in GABA-A receptors. *Biophys J* 77:2563–2574.
- Wolf BB, Green DR (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 274:20049–20052.
- Wong H, Anderson WD, Cheng T, Riabowol KT (1994) Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the “primer-dropping” method. *Anal Biochem* 223:251–258.
- Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kaegi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, Mak TW (1998) Essential contribution of caspase-3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* 12:806–819.
- Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B (2005) Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci* 8:1069–1077.
- Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH, Reichardt LF (2003) Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* 6:736–742.

- Yakovlev AG, Faden AI (1994) Sequential expression of c-fos protooncogene, TNF-alpha, and dynorphin genes in spinal cord following experimental traumatic injury. *Mol Chem Neuropathol* 23:179–190.
- Yamakura T, Harris RA (2000) Effects of gaseous anesthetics nitrous oxide and xenon on ligand-gated ion channels. Comparison with isoflurane and ethanol. *Anesthesiology* 93:1095–1101.
- Yan Q, Radeke MJ, Matheson CR, Talvenheimo J, Welcher AA, Feinstein SC (1997) Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol* 378:135–157.
- Yang J, Cron P, Thompson V, Good VM, Hess D, Hemmings BA, Barford D (2002) Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Mol Cell* 9:1227–1240.
- Yang J, Siao C, Nagappan G, Marinic T, Jing D, McGrath K, Chen Z, Mark W, Tessarollo L, Lee F, Lu B, Hempstead B (2009) Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci* 12:113–115.
- Yon JH, niel-Johnson J, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V (2005) Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience* 135:815–827.
- Yoon S, Seger R (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24:21–44.
- Yoshida C, Takeichi M (1982) Teratocarcinoma cell adhesion: identification of a cell-surface protein involved in calcium dependent cell aggregation. *Cell* 28:217–224.
- Zafra F, Castren E, Thoenen H, Lindholm D (1991) Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10037–10041.
- Zakharov VV, Mosevitsky MI (2007) M-calpain-mediated cleavage of GAP-43 near Ser41 is negatively regulated by protein kinase C, calmodulin and calpain-inhibiting fragment GAP-43-3. *J Neurochem* 101:1539–1551.
- Zhang F, Strand A, Robbins D, Cobb MH, Goldsmith EJ (1994) Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* 367:704–711.
- Zhang Y, Moheban DB, Conway BR, Bhattacharyya A, Segal RA (2000) Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J Neurosci* 20:5671–5678.
- Zhang Y, Zhen Y, Dong Y, Xu Z, Yue Y, Golde TE, Tanzi RE, Moir RD, Xie Z (2011) Anesthetic propofol attenuates the isoflurane-induced caspase-3 activation and A $\beta$  oligomerization. *PLoS One* 6:e27019.
- Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE (1995) Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 270:12665–12669.
- Zhou XF, Parada LF, Soppet D, Rush RA (1993) Distribution of TrkB tyrosine kinase immunoreactivity in the rat central nervous system. *Brain Res* 622:63–70.
- Zhou XF, Song XY, Zhong JH, Barati S, Zhou FH, Johnson SM (2004) Distribution and localization of pro-brain-derived neurotrophic factor-like immunoreactivity in the peripheral and central nervous system of the adult rat. *J Neurochem* 91:704–715.

Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR (2001) The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 92:57–70.

Ziv NE, Garner CC (2004) Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly. *Nat Rev Neurosci* 5:385–399.

## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Jelena Popić je rođena 04.11.1978. godine u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala 1997. godine, a završila 2006. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija, smer Genetičko inženjerstvo i biotehnologija sa opštim uspehom 8,72 u toku studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske studije je upisala 2006. godine na smeru Molekularna biologija na Biološkom fakultetu. Od 2006. godine je zaposlena na Odeljenju za neurobiologiju, u Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu.

Naučno-istraživački rad Jelene Popić je realizovan kroz projekte finansirane od strane Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije. 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 je učesnik 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. U periodu 2006 – 2007. godine bila je član istraživačkog tima na projektu „Efekat dijetalne restrikcije na sinaptičku plastičnost mozga tokom starenja“ u okviru slovenačko-srpske bilateralne saradnje. U periodu 2007 – 2010. godine učestvovala je na projektu „The role of neurotrophins in anesthesia-induced developmental neuroapoptosis“ (NIH, FIRCA award, GC11479-128322, nosioci: dr Sabera Ruždijić i dr Vesna Jevtović-Todorović). Učestvuje i u realizaciji bilateralnog DAAD projekta sa Nemačkom („Uticaj dijetalne restrikcije na plastičnost centralnog i enteričkog nervnog sistema tokom starenja“; 2011-2012).

Koautor je 7 radova u vodećim međunarodnim časopisima, kao i brojnih domaćih i međunarodnih kongresnih saopštenja.