

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Snežana Z. Rauš

**UTICAJ ELEKTROMAGNETNOG POLJA  
(0,5 mT, 50 Hz) NA MOTORNO PONAŠANJE,  
PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA I  
MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE MOZGA  
NAKON EKSPERIMENTALNO IZAZVANE  
MOŽDANE ISHEMIJE NA MODELU  
PUSTINJSKOG MIŠA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Snežana Z. Rauš

**INFLUENCE OF ELECTROMAGNETIC FIELD  
(0,5 mT, 50 Hz) ON MOTOR BEHAVIOUR,  
OXIDATIVE STRESS PARAMETERS AND  
MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF  
BRAIN AFTER GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA  
IN MONGOLIAN GERBILS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

**Mentori:**

dr Branka Janać, viši naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu

dr Lidija Radenović, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Komisija za ocenu i javnu odbranu disertacije:**

dr Vesna Selaković, redovni profesor, Vojnomedicinska akademija, Beograd

dr Zlatko Prolić, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

dr Milica Manojlović-Stojanoski, viši naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

dr Sonja Radaković, vanredni profesor, Vojnomedicinska akademija, Beograd

Datum odbrane: 2012.

Eksperimentalna istraživanja u okviru ove disertacije su većim delom urađena u Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu, u Odeljenju za neurofiziologiju, a delom na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu.

Dr Branki Janać dugujem veliku zahvalnost za revnost u obavljanju svojih mentorskih zadataka i ukazano poverenje. Takođe, zahvaljujem se dr Lidiji Radenović i dr Vesni Selaković na korisnim savetima i sugestijama. Dr Milici Manojlović-Stojanoski se zahvaljujem na stručnim savetima i upoznavanjem sa modernim metodama stereološke analize, kao i pomoći u primeni i razumevanju tih metoda.

Zahvaljujem se dr Gordani Karteliji, dr Zlatku Proliću, mr Dajani Todorović, Ljiljani Nikolić, kolegama sa odeljenja za citologiju i sa doktorskih studija, kao i svim mojim prijateljima, na podršci i na svakoj ukazanoj pomoći prilikom izrade ove disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem mojoj porodici i mužu na bezgraničnom razumevanju i strpljenju.

Uticaj elektromagnetnog polja (0,5 mT, 50 Hz) na motorno ponašanje, parametre oksidativnog stresa i morfološke karakteristike mozga nakon eksperimentalno izazvane moždane ishemije na modelu pustinjačkog miša

## Rezime

U današnje vreme, jedna od najčešćih bolesti koja pogađa celokupno društvo je moždani udar, koji može biti uzrokovan moždanom ishemijom. Osim što u velikom procentu dovodi do smrti, posledice moždanog udara su najčešće trajne i za njih ne postoji efikasna terapija. Još jedna karakteristika modernog doba je razvitak elektronske industrije i primena sve raznovrsnijih električnih uređaja, a samim tim i povećanje stepena zagađenja "elektromagnetnim smogom". Povećano prisustvo niskofrekventnih elektromagnetnih polja (EMP) je privuklo interesovanje velikog broja naučnika te su ispitivani njegovi efekti, između ostalog i na funkcionalne karakteristike centralnog nervnog sistema. Na osnovu poznatih činjenica o njegovom dejstvu možemo pretpostaviti da ovo polje utiče i na razvoj patofizioloških događaja i oporavak u uslovima moždane ishemije.

Cilj naše studije je bio da ispitamo da li elektromagnetno polje (0,5 mT, 50 Hz, u trajanju od 7 dana) utiče na hipermotorno ponašanje pustinjačkih miševa izazvano 10-min globalnom moždanom ishemijom i to 1., 2., 4. i 7. dana (neposredan efekat EMP), kao i 14. dana nakon reperfuzije (odloženi efekat EMP). Takođe, na modelu moždane ishemije smo ispitali da li primenjeno EMP utiče na parametre oksidativnog stresa, koji su inače povišeni nakon moždane ishemije, u pojedinim regionima mozga 7. i 14. dana nakon reperfuzije. Praćen je i uticaj EMP na morfološke promene u najosetljivijim strukturama mozga (hipokampus, striatum i kora velikog mozga) izazvane ishemijom 7. i 14. dana

nakon reperfuzije i morfometrijskom analizom su kvantifikovane promene na neuronima i glijalnim ćelijama.

Ponašanje eksperimentalnih životinja je registrovano u trajanju od 60 minuta u testu otvorenog polja - "open field"-u. Pokazano je da 10-min ishemija indukuje značajno povećanje motorne aktivnosti (lokomocija, stereotipija i rotacije) do 4. dana nakon reperfuzije. Izlaganje eksperimentalnih životinja EMP je inhibiralo razvitak hipermotorne aktivnosti izazvane ishemijom i to značajno u prva dva dana nakon reperfuzije kada je i postishemijska hiperaktivnost najuočljivija. Motorna aktivnost ovih pustinjskih miševa je bila značajno povećana u poređenju sa kontrolnom grupom samo prvog dana nakon reperfuzije.

Biohemijski su određeni parametri oksidativnog stresa (NO, O<sub>2</sub>, SOD, ILP) u hipokampusu, striatumu i kori prednjeg mozga. Ishemija dovodi do povećanja oksidativnog stresa u svim ispitivanim strukturama mozga i to kako 7. tako i 14. dana nakon reperfuzije, a vrednosti za SOD ostaju na kontrolnom nivou. EMP takođe povećava produkciju slobodnoradikalnih vrsta 7. dana (neposredni efekat EMP) ali u značajno većoj meri nego ishemija, kao i aktivnost SOD. Sedam dana nakon završetka izlaganja (odloženi efekat EMP) izmerene vrednosti parametara oksidativnog stresa su na nivou kontrolnih. Ishemični pustinjski miševi izloženi EMP imaju povećane vrednosti merenih parametara oksidativnog stresa 7. dana nakon reperfuzije (neposredni efekat EMP), ali u znatno manjoj meri nego jedinice ishemične grupe ili grupe izložene EMP. Parametri oksidativnog stresa u mozgu ishemičnih pustinjskih miševa izloženih EMP su na nivou kontrolnih 14. dana nakon reperfuzije.

Primenom stereoloških metoda, utvrđeni su volumeni striatuma i hipokampusa, volumenska gustina oštećenih neurona i astrocita, kao i broj mikroglijalnih ćelija po jedinici površine u hipokampusu. Izlaganje EMP nije dovelo do morfoloških promena u ispitivanim strukturama, dok je 10-min globalna moždana ishemija dovela do ćelijske smrti u najvećoj meri u CA1 regionu hipokampusa. Ishemični pustinjski miševi izloženi EMP su imali

znatno niži stepen propalih ćelija i veći odgovor astrocita i mikroglialnih ćelija nego postishemijski pustinjaški miševi bez izlaganja 7. dana nakon reperfuzije (neposredni efekat EMP). Sličan odgovor je zapažen i 14. dana nakon reperfuzije (odloženi efekat EMP).

Rezultati ovih istraživanja su pokazali da primenjeno EMP (0,5 mT, 50 Hz) smanjuje motornu hiperaktivnost izazvanu 10-min globalnom moždanom ishemijom modulacijom procesa koji leže u osnovi ovakvog ponašanja. Takođe, EMP smanjuje oksidativni stres izazvan globalnom moždanom ishemijom i na taj način smanjuje moguće negativne posledice koje slobodnoradikalske vrste imaju u mozgu. EMP pokazuje i neuroprotektivnu ulogu u hipokampusu, najosetljivijoj strukturi na ishemijsko oštećenje, redukujući broj oštećenih neurona i aktivirajući astrocite i mikroglialne ćelije.

ključne reči: moždana ishemija, elektromagnetno polje, motorno ponašanje, oksidativni stres, morfologija

naučna oblast: Neuronauke

uža naučna oblast: Neurobiologija sa neuroimunologijom

UDK broj: [615.849.11:613.648.2]:591.5:[575.343:577.334]+[612.82:611.018.8]:

[616-005.4](043.3)

Influence of electromagnetic field (0,5 mT, 50 Hz) on motor behaviour, parameters of oxidative stress and morphological characteristics of brain after global cerebral ischemia in Mongolian gerbils

### Summary

Nowadays, one of the most common diseases, which affect the whole society, is brain stroke, which can be caused by cerebral ischemia. Beside high mortality rate, consequences of brain stroke are often permanent without appropriate treatment. Another hallmark of modern society is development of electronic industry and usage of diverse electron devices, therefore increasing degree of pollution with “electromagnetic smog”. The increased presence of extremely low frequency magnetic fields (ELF-MF) has attracted the interest of many scientists to explore its effects, among others, on functional properties of central nervous system. Based on the known facts of its action, we can propose that this field affects development of pathophysiological events and recovery in conditions like cerebral ischemia.

The purpose of this study was to determine whether ELF-MF (0.5 mT, 50 Hz, continuous exposure during 7 days) affects hypermotor activity of gerbils, induced by 10-min global cerebral ischemia on the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day (immediate effect) as well as on the 14<sup>th</sup> day after reperfusion (delayed effect). Also, on this model we examined whether applied ELF-MF affect oxidative stress parameters, otherwise increased after cerebral ischemia, in some brain regions on the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> reperfusion day. Also, we examined effect of ELF-MF on morphological changes in the most vulnerable structures of brain (hippocampus, striatum and forebrain cortex) induced by ischemia on the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> reperfusion day, as well as performed quantification of this changes in neurons and glial cells.

Animal behaviour was monitored for 60 min in the open field. It was shown that the 10-min global cerebral ischemia *per se* induced a significant

motor activity increase (locomotion, stereotypy and rotations), and consequently immobility decrease until day 4 after reperfusion, compared to control gerbils. Exposure to ELF-MF inhibited development of ischemia-induced motor hyperactivity during the whole period of registration, but significantly in the first 2 days after reperfusion, when the postischemic hyperactivity was most evident. Motor activity of these gerbils was still significantly increased compared to control ones, but only on the 1<sup>st</sup> day after reperfusion.

Parameters of oxidative stress (NO, O<sub>2</sub>, SOD, ILP) were determined in hippocampus, striatum and forebrain cortex applying biochemical assays. Ischemia *per se* caused increasing of oxidative stress in all examined structures on the 7<sup>th</sup> and also 14<sup>th</sup> reperfusion day with SOD values on the control level. ELF-MF also increased production of free radical species on the 7<sup>th</sup> day (immediate effect of ELF-MF) but in higher degree than ischemia, as well as, activity of SOD. 7 days after cessation of exposure (delayed effect of ELF-MF) measured values for all parameters were at the control levels. Ischemic gerbils exposed to ELF-MF had increased values of parameters of oxidative stress on the 7<sup>th</sup> reperfusion day (immediate effect of ELF-MF) but to a lesser extent than ischemic animals or animals exposed to ELF-MF. On the 14<sup>th</sup> reperfusion day, parameters of oxidative stress in the brain of ischemic gerbils exposed to ELF-MF were at the control levels.

Applying stereological methods, histological evaluation of changes in the hippocampus was done determining its volume, volume density of degenerating neurons and astrocytes, as well as the number of microglial cells per unit area. ELF-MF *per se* did not induce any morphological changes in the examined brain structures, while 10-min global cerebral ischemia led to neuronal death, especially in CA1 region of the hippocampus, as expected. Ischemic gerbils exposed to ELF-MF had significantly lower degree of cell loss in the examined structure and greater response of astrocytes and microglial cells than postischemic gerbils without exposure on the 7<sup>th</sup> day after reperfusion

(immediate effect of ELF-MF). Similar response was observed on the 14<sup>th</sup> day after reperfusion (delayed effect of ELF-MF), however differences in measured parameters were not significant.

Results of this study revealed that the applied ELF-MF (0.5 mT, 50 Hz) decreased motor hyperactivity induced by the 10-min global cerebral ischemia, via modulation of the processes that underlie this behavioural response. Also, ELF-MF decreased oxidative stress induced by global cerebral ischemia thus decreasing possible negative consequences which free radical species have in the brain. Applied ELF-MF has possible neuroprotective function in the hippocampus, the most sensitive brain structure in the model of global cerebral ischemia, through reduction of neuronal death and activation of astrocytes and microglial cells.

key words: cerebral ischemia, electromagnetic field, motor behaviour, oxidative stress, morphology

Scientific field: Neuroscience

Narrower scientific field: Neurobiology with Neuroimmunology

UDK number: [615.849.11:613.648.2]:591.5:[575.343:577.334]+[612.82:611.018.8]:

[616-005.4](043.3)

1. Uvod .....	1
1.1. Patofiziološki aspekti moždane ishemije.....	3
1.1.1. Ekscitotoksičnost – uloga glutamata i kalcijuma.....	4
1.1.2. Periinfarktne depolarizacije i pH.....	7
1.1.3. Oksidativni stres.....	8
1.1.4. Ćelijska smrt.....	11
1.1.5. Inflamacija.....	14
1.1.6. Neurovaskularne promene.....	15
1.1.7. Aktivacija glijalnih ćelija.....	16
1.1.7.1. Astrociti.....	16
1.1.7.2. Mikroglia.....	19
1.1.8. Promene u ponašanju.....	20
1.1.8.1. Motorna aktivnost.....	21
1.1.9. Strukture uključene u kontrolu motorne aktivnosti.....	21
1.1.9.1. Bazalne ganglije.....	22
1.1.9.2. Hipokampus.....	25
1.2. Elektromagnetna polja – ekološki faktor i terapijsko sredstvo.....	28
1.2.1. Poreklo i karakteristike.....	28
1.2.2. Interakcija sa biološkim sistemima.....	31
1.2.3. Primena u medicini.....	36
2. Ciljevi istraživanja.....	39
3. Materijal i metode.....	40
3.1. Eksperimentalne životinje.....	40
3.2. Eksperimentalni model globalne moždane ishemije.....	41
3.3. Elektromagnetno polje.....	42
3.4. Motorno ponašanje.....	43
3.5. Eksperimentalna procedura.....	44
3.6. Histološka analiza.....	45
3.7. Biohemijska analiza.....	51
3.7.1. Određivanje proteina.....	52
3.7.2. Određivanje koncentracije O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	52
3.7.3. Određivanje koncentracije NO.....	53
3.7.4. Određivanje aktivnosti ukupne SOD.....	54
3.7.5. Određivanje indeksa lipidne peroksidacije.....	55
3.8. Statistička analiza.....	55
4. Rezultati.....	57
4.1. Efekti EMP (0,5 mT, 50 Hz) na motorno ponašanje pustinjskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom.....	57
4.2. Efekti EMP (0,5 mT, 50 Hz) na morfološke karakteristike mozga pustinjskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom.....	62

4.2.1. Hipokampus-histološke i morfometrijske karakteristike.....	62
4.2.1.1. Efekat EMP na hipokampalne neurone u mozgu pustinjskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom-kvantifikacija FJ obeleženih neurona.....	65
4.2.1.2. Efekat EMP na morfologiju i broj astrocita u hipokampusu pustinjskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom.....	66
4.2.1.3. Efekat EMP na morfologiju i broj mikroglijalnih ćelija u hipokampusu pustinjskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom.....	68
4.2.2. Histološke i morfometrijske karakteristike striatuma i kore velikog mozga.....	70
4.2.2.1. Efekat EMP na neurone u striatumu i kori velikog mozga pustinjskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom- FJ obeleženi neuroni.....	73
4.3. Efekti EMP (0,5 mT, 50 Hz) na parametre oksidativnog stresa pustinjskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom.....	74
5. Diskusija.....	81
5.1. Uticaj EMP (0,5 mT, 50 Hz) na motorno ponašanje pustinjskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom.....	83
5.2. Uticaj EMP (0,5 mT, 50 Hz) na morfološke karakteristike mozga pustinjskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom.....	91
5.3. Uticaj EMP (0,5 mT, 50 Hz) na parametre oksidativnog stresa u mozgu pustinjskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom.....	98
6. Zaključci.....	104
7. Literatura.....	106
Biografija.....	126
Prilog 1.....	128
Prilog 2.....	129
Prilog 3.....	131

## 1. UVOD

Moždani udar predstavlja treći vodeći uzrok smrtnosti u svetu odmah nakon srčanih bolesti i malignih oboljenja. Osobe koje su doživele moždani udar ispoljavaju različite neurofiziološke ali i neuropsihološke poremećaje kao što su afazija (poremećaj jezičkih sposobnosti), smanjena intelektualna sposobnost, oštećena prostorna orijentacija i radna memorija (Bokura i Robinson, 1997; Bradvik i sar., 1989; Godefroy i sar., 1994). Ovi neuropsihološki poremećaji mogu u velikoj meri oštetiti reintegraciju pacijenta i usporiti proces rehabilitacije. Danas postoji svega nekoliko uspešnih terapija za prevazilaženje posledica moždanog udara, tako da je razvoj novih jedan od glavnih ciljeva istraživanja u ovoj oblasti.

Moždani udar može biti podeljen na dve kategorije - ishemični (smanjen ili prekinut dotok krvi u mozak) i hemoragični (akumulacija krvi u mozgu). Ishemični moždani udar je češći i čini oko 87 % svih slučajeva (Rosamond i sar., 2007). Tromboza, embolizam ili sistemska hipoperfuzija smanjuju protok krvi u mozgu što izaziva ishemični udar usled nedovoljnog dotoka kiseonika i glukoze neophodnih za održavanje ćelijske homeostaze. Svi ovi događaji pokreću više procesa uključujući ekscitotoksičnost, acidotoksičnost i jonski disbalans, periinfarktne depolarizacije, inflamaciju, oksidativni i nitrativni stres, koji dovode do ćelijske smrti ili apoptoze (Gonzalez i sar., 2006). Svaki od ovih patofizioloških procesa ima određeni vremenski okvir - neki se javljaju u roku od nekoliko sati nakon moždanog udara i/ili traju danima uzrokujući oštećenje neurona, glije i endotelijalnih ćelija, a u zavisnosti od jačine moždanog udara. Sve je više potvrda da je osetljivost na oštećenje nakon moždanog udara zavisno od pola (Hurn i sar., 2005). Žene su manje osetljive na ishemijsko oštećenje i rizik od moždanog udara je manji kod premenopauzalnih žena u odnosu na muškarce istih godina (Thorvaldesen i sar., 1997).

Iako ljudski mozak čini svega 2 % telesne mase, za normalno funkcionisanje koristi 20 % ukupnog kiseonika (Edvinsson i Krause, 2002). Mozak zahteva veliku količinu kiseonika kako bi stvorio neophodan ATP (u procesu oksidativne fosforilacije) i time, između ostalog, održao jonski gradijent. Poznato je da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze na plazma membrani neurona troše 70 % energije prisutne u mozgu (Edvinsson i Krause, 2002). Ova jonska pumpa održava visoku unutarćelijsku koncentraciju  $\text{K}^+$  i nisku unutarćelijsku koncentraciju  $\text{Na}^+$  neophodnu za prostiranje akcionih potencijala. Nakon globalne moždane ishemije, mitohondrijalna inhibicija sinteze ATP dovodi do toga da se ATP potroši u roku od 2 min što uzrokuje depolarizaciju membrane neurona, oslobađanje  $\text{K}^+$  u vanćelijski prostor i ulazak  $\text{Na}^+$  u ćelije (Caplan, 2000). Nedostatak energije, takođe, sprečava membranske  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaze da održavaju nisku koncentraciju  $\text{Ca}^{2+}$  u ćelijama.

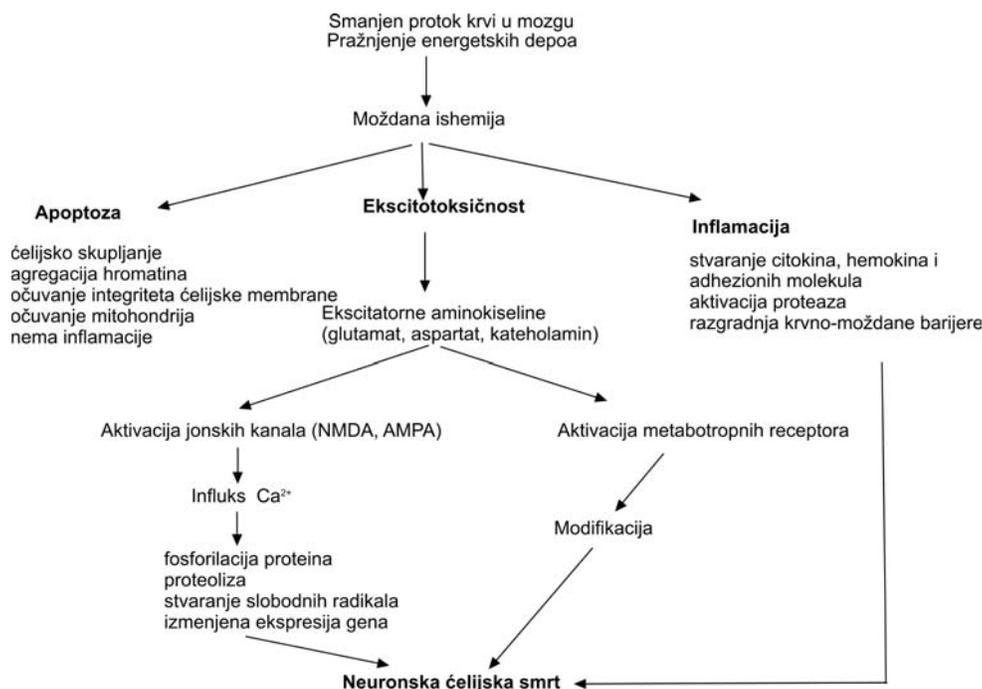
Normalni protok krvi u mozgu čoveka iznosi 50 ml/100 g/min (Kety i Schmidt, 1948). Uobičajen način definisanja moždane ishemije je upotrebom pojma „prag moždane ishemije“. Prag ispod koga dolazi do oštećenja funkcije neurona je 15-18 ml/100 g/min. To je minimalni protok neophodan za održavanje električnih karakteristika neurona i karakteriše se kao izoelektrični EEG (Siesjo, 1984). U ovom slučaju postoji dovoljno kiseonika za održavanje ćelijske funkcije, ali nedovoljno za podržavanje sinaptičke transmisije. Prag za održavanje jonskog gradijenta je približno 10 ml/100 g/min i pretpostavlja se da je to prag za pojavu ireverzibilnih neuroloških promena u mozgu (Astrup i sar. 1981).

U slučaju da je do ishemijske povrede došlo u određenom regionu mozga govorimo o fokalnoj ishemiji, a ako je do takve povrede tj. smanjenja protoka krvi došlo u celom mozgu govorimo o globalnoj moždanoj ishemiji (Harukuni i Bhardwaj, 2006). Kada se zna da u fokalnoj ishemiji 65 % moždanih udara je rezultat vaskularne okluzije na području srednje moždane artertije, 2 %

u anteriornoj i 9 % u posteriornoj moždanoj arteriji, 15 % u moždanom stablu i cerebelumu, jasno je zašto se u eksperimentalnim istraživanjima najčešće koriste modeli sa okluzijom srednje moždane arterije. Najčešći animalni modeli za globalnu ishemiju su glodari čija je prednost to što nisu skupi, imaju mogućnost reprodukcije povrede i homogenost unutar sojeva. Eksperimentalni modeli globalne ishemije su: srčani zastoj, selektivni prekid moždane cirkulacije, *in vitro* ishemija i *ex vivo* oživljavanje (Hossmann, 2008). Selektivni prekid moždane cirkulacije se dalje deli na kompletnu i nekompletnu ishemiju. U modelu globalne moždane ishemije najčešće se vrši: okluzija 4 krvna suda (permanentna okluzija vertebralnih arterija, a karotidnih u trajanju 10-30 min kod pacova; Pulsinelli i sar., 1983), okluzija 2 krvna suda sa hipotenzijom (prolazna okluzija obe karotidne arterije sa istovremenom arterijskom hipotenzijom kod pacova; Pulsinelli i sar., 1983) i prolazna okluzija obe karotidne arterije kod pustinjskog miša (*Meriones unguiculatus*) koja je kod ovih životinja dovoljna da dovede do globalne moždane ishemije usled toga što oni poseduju nekompletna Vilisov krug (Kirino, 1982).

### 1.1. Patofiziološki aspekti moždane ishemije

Moždana ishemija rezultuje u brojnim hemodinamskim, biohemijskim i neurofiziološkim promenama koje mogu biti klinički povezane sa promenama u ponašanju (slika 1.). Smanjenje protoka krvi u mozgu prvo pogađa funkciju neurona, a kako ishemija napreduje smanjuje se i metabolička aktivnost koja je neophodna za održavanje strukturnog integriteta ćelija (Hossmann, 1998), što aktivira nekoliko puteva koji mogu biti pogubni ili neuroprotektivni za mozak. Ovi događaji se preklapaju i zavise od inteziteta i trajanja ishemijskog oštećenja.



**Slika 1.** Shema događaja koji dovode do ishemijske povrede mozga. Preuzeto i modificirano iz Harukuni i Bhardwaj (2006).

### 1.1.1. Ekscitotoksičnost – uloga glutamata i $\text{Ca}^{2+}$

Glutamat je glavni ekscitatorni neurotransmiter u mozgu sisara i ključni medijator unutarćelijske komunikacije, plastičnosti, rasta i diferencijacije ćelija centralnog nervnog sistema. U fiziološkim uslovima glutamat je odgovoran za inicijaciju postsinaptičkih signala kroz odvojene jonotropne i metabotropne receptore i njegova vanćelijska koncentracija se održava u  $\mu\text{M}$ , a citosolna u mM (oko 10 mM) opsegu (Hsu, 1998). Nakon ishemije dolazi do masovnog oslobađanja glutamata (Budd, 1998) što rezultuje u nemogućnosti preuzimanja glutamata od strane astrocita (Mori i sar., 2004; Giffard i Swanson, 2005). Veliki gradijent koncentracije glutamata se održava kroz plazma membranu uz pomoć  $\text{Na}^+$  zavisnog glutamatnog transportera lociranog na pre- i postsinaptičkim membranama. Membranska depolarizacija i akumulacija  $\text{Na}^+$  u nervnoj ćeliji

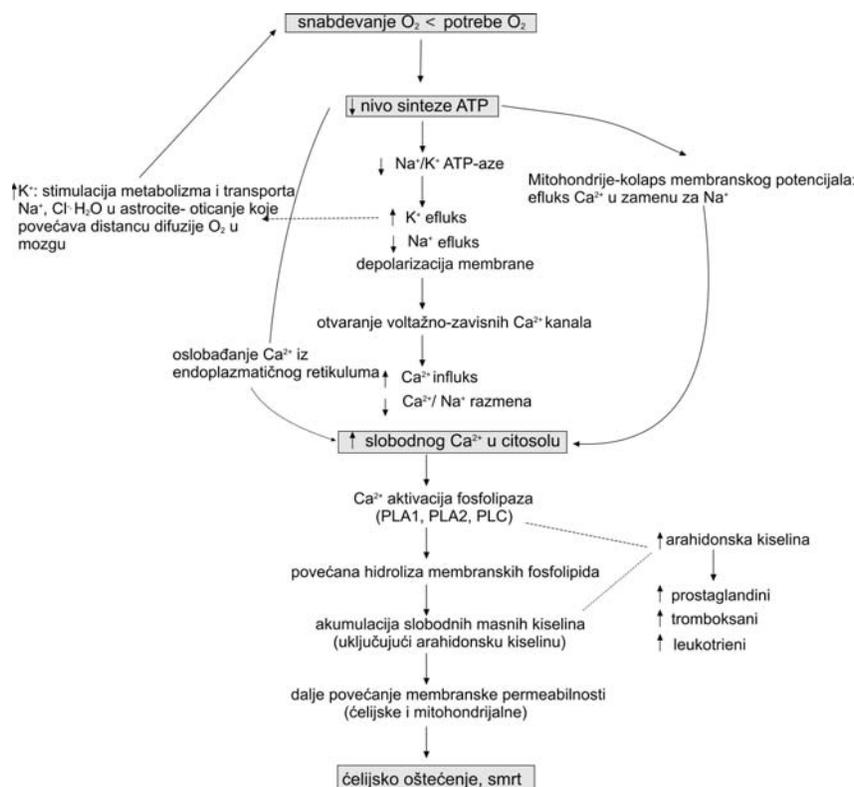
tokom ishemije indukuju reverziju glutamatnog transportera i dozvoljavaju glutamatu da izlazi iz ćelije duž koncentracionog gradijenta.

Efekat povećane koncentracije glutamata na sinapsama je aktivacija N-metil-D-aspartat (NMDA) i  $\alpha$ -amino-3-hidroksil-5-metil-4-izoksazol-propionska kiselina (AMPA) receptora (Doyle, 2008). Otvaranjem ovih receptora (naročito NMDA) dolazi do daljeg ulaska  $\text{Ca}^{2+}$  i membranske depolarizacije doprinoseći „preopterećenju ćelija  $\text{Ca}^{2+}$ “ tj. ekscitotoksičnosti (Doyle, 2008).

Joni  $\text{Ca}^{2+}$  su regulatori brojnih ćelijskih procesa uključujući funkciju enzima, ćelijskog rasta i diferencijacije. Pored toga,  $\text{Ca}^{2+}$  je odgovoran za oslobađanje neurotransmitera, modulaciju membranske ekscitabilnosti i regulaciju sinaptičke plastičnosti u nervnom sistemu. Vanćelijski  $\text{Ca}^{2+}$  ulazi u ćelije kroz voltažno zavisne  $\text{Ca}^{2+}$  kanale, kanale za transmitere permeabilne za  $\text{Ca}^{2+}$  ili kroz izmenjivače jona. Fiziološka koncentracija slobodnog unutarćelijskog  $\text{Ca}^{2+}$  se održava u granicama do 100 nM, u poređenju sa približno 1 mM u vanćelijskom prostoru, kroz regulaciju influksa, skladištenja i oslobađanja  $\text{Ca}^{2+}$ .

NMDA receptori su glavni put ulaska  $\text{Ca}^{2+}$  tokom glutamatergičke transmisije. Pored jonotropnih receptora, glutamat takođe stimuliše familiju metabotropnih receptora koji aktiviraju put sekundarnih glasnika što rezultuje u oslobađanju unutarćelijskog  $\text{Ca}^{2+}$ . Povećanje unutarćelijskog  $\text{Ca}^{2+}$  pokreće kaskadu patobiohemijskih procesa koji dovode do neuronske degeneracije posredstvom aktivacije proteaza, lipaza i endonukleaza, što posledično dovodi do oštećenja ćelijske membrane, citoskeleta i genomske DNK (slika 2.). Joni  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviraju i fosfolipaze A i C koje hidrolizuju membranske fosfolipide, što rezultuje u akumulaciji slobodnih masnih kiselina, naročito arahidonske što ima za posledicu pokretanje inflamatornih procesa i dalje oštećenje ćelijskih membrana (Murdoch i Hall, 1990).

Prekomerni influks  $\text{Ca}^{2+}$  može dovesti do aktivacije neuronske azot oksid sintaze (nNOS) i oslobađanja azot oksida (NO). Oslobođeni NO dalje vodi do formiranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) u koje spadaju: superoksid ( $\text{O}_2^-$ ), peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) i hidroksil ( $\text{OH}^\cdot$ ) radikali (Beckman i sar., 1990). Važna meta  $\text{ONOO}^-$  su mitohondrije. Mitohondrijalna disfunkcija tokom hipoksije/ishemije ima za posledicu povećanu produkciju kiseoničnih radikala što vodi do dalje disfunkcije membrane neurona i nekroze (Mehta, 2007). Povećana produkcija slobodnih radikala tokom reperfuzije dovodi do aktivacije matriksnih metaloproteinaza koje dalje degradiraju kolagen i laminin u bazalnoj lamini, narušavaju integritet zidova krvnih sudova, povećavaju propustljivost krvnomoždane barijere (KMB) a što za posledicu može imati stvaranje edema u mozgu (Crack i Taylor, 2005).



**Slika 2.** Progresija metaboličkih događaja iniciranih u ćelijama osetljivim na ograničeno snabdevanje kiseonikom. Preuzeto iz Messick i Milde (1987).

### 1.1.2. Periinfarktne depolarizacije i pH

Tokom hipoksije dolazi do opadanja sinaptičke inhibicije, nakon čega dolazi do smanjenja sinaptičke ekscitacije, dovodeći do perioda hiperekscitabilnosti (Krnjević i sar., 1991). Postsinaptička hiperpolarizacija je posredovana pojačanom provodljivošću za jone  $K^+$ .

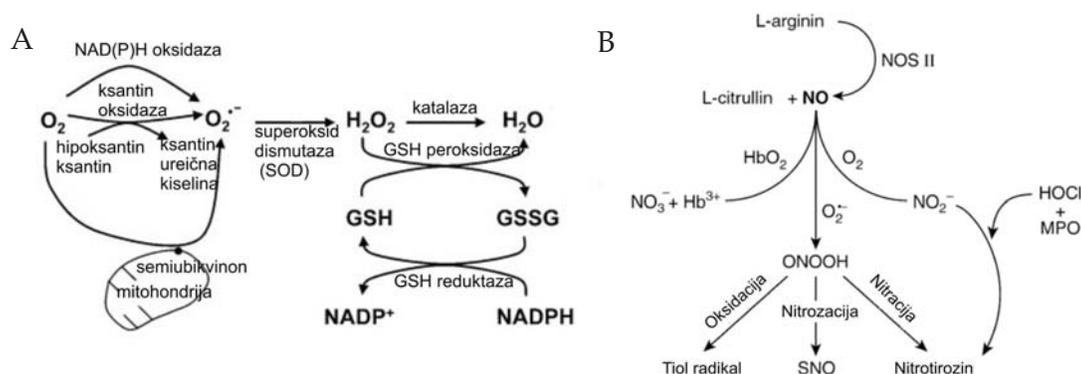
Većina istraživanja, uglavnom na neuronima ili nervno-mišićnim preparatima, je pokazala da nedostatak kiseonika u početku dovodi do porasta ekscitacije koju prati supresija funkcije. Kada je uočena zavisnost  $Na^+/K^+$  pumpe od ATP bilo je lako zaključiti da hipoksična depolarizacija nastaje usled nedostatka ATP.

Moždana ishemija selektivno smanjuje električnu aktivnost prvo u hipokampusu i cerebelumu, a onda i u ostalim regionima mozga kod mačke (Rossen i sar., 1943). U CA1 regionu hipokampusa odgovor na ishemiju je sledeći: prolazna mala depolarizacija i povećanje ekscitabilnosti neposredno praćeno naknadnim hiperpolarizacijama i značajnim padom membranskog otpora; nakon reoksigenacije dolazi do dalje prolazne depolarizacije pre vraćanja na kontrolne nivoe (Krnjević, 2008).

Tokom ishemije metabolizam glukoze je prebačen sa puta aerobne fosforilacije na anaerobni glikolitički put što rezultuje u akumulaciji ćelijskog laktata i smanjenju pH (Doyle i sar., 2008). Mehanizmi neuronske povrede usled akumulacije laktata tokom moždane ishemije su nekroza endotelijalnih ćelija sa oticanjem i rupturom astrocita što dovodi do redukcije kolateralnog krvotoka, denaturacije i inaktivacije proteina uključujući i enzime, supresije regeneracije nikotinamid adenin dinukleotida ( $NAD^+$ ) i produkcije ROS.

### 1.1.3. Oksidativni stres

Masivno stvaranje slobodnih radikala može da ima odlučujući efekat na celokupne fiziološke funkcije važne za preživljavanje. Koncentracija slobodnih radikala i reaktivnih neradikalskih vrsta je određena balansom između procesa stvaranja i uklanjanja raznim jedinjenjima i enzimima antioksidativne zaštite (slika 3.). Halliwell i Gutteridge (1995) su definisali antioksidante kao supstance sposobne da, u relativno niskim koncentracijama u odnosu na koncentraciju supstrata koji može da se oksiduje, značajno odlože ili inhibiraju oksidaciju ovih supstrata. Sistem antioksidativne zaštite uključuje enzime superoksid dismutazu (SOD), glutation peroksidazu (GPx) i katalazu (CAT), kao i neenzimatska jedinjenja kao što su  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E),  $\beta$ -karoten, askorbat (vitamin C) i glutation (Droge, 2002).

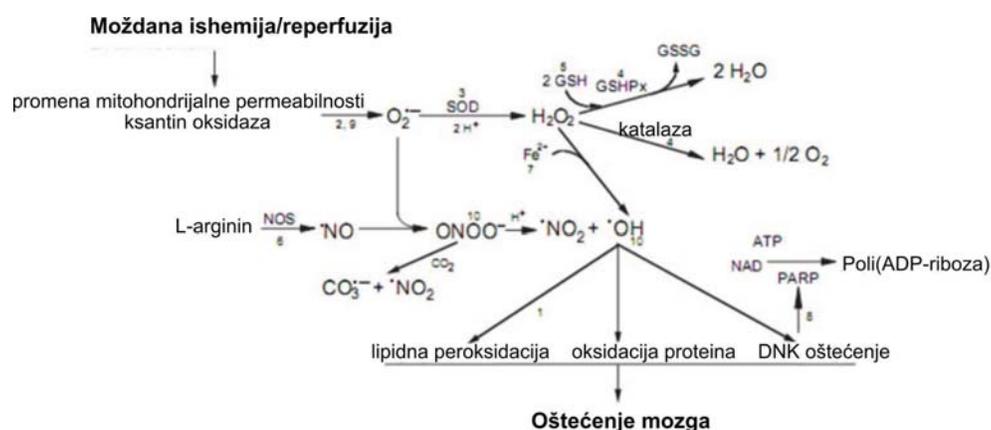


**Slika 3.** A. Putevi produkcije i uklanjanja ROS. GSH, glutation; GSSG, glutation disulfid. Preuzeto iz Dröge (2002). B. Sinteza reaktivnih azotnih vrsta. NO, azot oksid; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, nitrat; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, nitrit; HbO<sub>2</sub>, oksihemoglobin; Hb<sup>3+</sup>, methemoglobin; ONOOH, peroksinitritna kiselina; MPO, mijeloperoksidaza; HOCl, hipohlorna kiselina; SNO: S-nitrozotiol; NOS II, azot oksid sintaza II.

<http://ajplung.physiology.org/content/283/2/L246/F1.expansion.html>

Moždana ishemija i reperfuzija su odgovorni za oksidativni stres tj. stvaranje slobodnih radikala (Nita i sar., 2001) što kulminira u razarajućim efektima tokom patogeneze (Lewen i sar., 2000; Chan, 2001). Mozak je posebno

osetljiv na prisustvo slobodnih radikala zbog izuzetno visokog sadržaja lipida i relativno malog sadržaja endogenih antioksidanata (Sugawara i Chan, 2003). Tokom oksidativnog stresa, brza i velika produkcija slobodnih radikala prevazilazi mogućnost njihovog uklanjanja enzimima antioksidativne zaštite i neenzimatskim antioksidantima, što ima za posledicu teška i brza oštećenja ćelijskih proteina, DNK i lipida (Sies, 1993; Chan, 2001; slika 4.).



**Slika 4.** Formiranje reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta kao posledica ishemije/reperfuzije koje dovodi do oštećenja tkiva. 1. Inhibicija lipidne peroksidacije, 2. Inhibicija ksantin oksidaze, 3. Superoksid dismutaza (SOD), 4. Katalaza i glutation peroksidaza (GSHPx), 5. Glutation (GSH), 6. Inhibicija azot monoksid sintaze (NOS), 7. Metalni helatori, 8. Inhibitori poli(ADP-riboza) polimeraze (PARP), 9. Inhibitori tranzicije kroz mitohondrijalnu membranu, 10. „čistači“ peroksinitrita.  $O_2^-$ , superoksid;  $CO_3^{\cdot-}$ , karbonatni radikal;  $H_2O_2$ , vodonik peroksid; GSSG, glutation disulfid;  $OH^{\cdot}$ , hidroksil radikal;  $NO_2^{\cdot}$ , azot dioksid;  $NO^{\cdot}$ , azot monoksid;  $ONOO^-$ , peroksinitrit; NAD, nikotinamid adenin dinukleotid. Preuzeto i modifikovano iz Warner i sar. (2004).

Iako je stvaranje slobodnih radikala u mitohondrijama iz molekularnog kiseonika fiziološka reakcija, prevelika aktivacija NMDA receptora nakon moždane ishemije (ekscitotoksičnost) rezultuje u povećanoj produkciji ROS, naročito NO. Štaviše, oksidacija ksantina u hipoksantin uz pomoć enzima ksantin oksidaze je praćena stvaranjem  $O_2^-$  i  $H_2O_2$  što dalje doprinosi oštećenju neurona tokom reperfuzije (Beetsch i sar., 1998; Nishino i Tamura, 1991).

Peroksidacija lipidnih membrana od strane ROS stvara toksične aldehide kao što je 4-hidroksinonenal (4-HNE) koji oštećuje razne jonske kanale, transportere i citoskeletne proteine. Aktivacija fosfolipaze A2 (PLA2) nakon moždane ishemije oslobađa arahidonsku kiselinu iz membranskih fosfolipida. Oksidativni metabolizam i arahidonska kiselina predstavljaju značajan izvor ROS (Katsuki i Okuda, 1995). Slobodni radikali, takođe, aktiviraju specifične signalne puteve kao što su mitogen-aktivirane protein kinaze (MAPK) koje dalje doprinose ćelijskom oštećenju (Namura i sar., 2001). Produkcija NO i oksidativni stres su, takođe, povezani sa prevelikom aktivacijom poli(ADP-riboze)polimeraze-1 (PARP-1), DNK reparirajućeg enzima. Kao odgovor na prekidu u DNK, PARP-1 katalizuje transformaciju  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> u nikotin amid i duge polimere poliADP-riboze. Kada je PARP-1 previše aktiviran, iscrpljuje ćelijski NAD<sup>+</sup>, ometajući NAD<sup>+</sup> zavisne procese kao što su anaerobna glikoliza i mitohondrijalna respiracija, što dovodi do daljeg smanjenja ATP, nestašice energije i ćelijske smrti (Gonzales i sar., 2006).

Reoksigencija tokom reperfuzije obezbeđuje supstrat za brojne enzimske reakcije oksidacije. Reperfuzija nakon ishemije uzrokuje veliku produkciju ROS u mitohondrijama i konzumiranje endogenih antioksidanata od strane ovih ROS može dovesti do dramatičnog povećanja unutarćelijskog ROS. Povećana koncentracija ROS uzrokuje oslobađanje mitohondrijalnog citohroma c, perifernog membranskog proteina mitohondrija rastvorljivog u vodi i važne komponente mitohondrijalnog respiratornog lanca. Citohrom c se translocira iz mitohondrije u citosol nakon prolazne fokalne ishemije kod pacova, kao i nakon globalne moždane ishemije u osetljivim CA1 neuronima (Selaković i sar., 2005; Sugawara i sar., 1999). U radu Selaković i sar. (2005) je pokazano da kod pacijenata koji su doživeli moždani udar, aktivnost citohrom c oksidaze je smanjena u cerebrospinalnoj tečnosti naročito u prva dva dana nakon ishemije i da se postepeno povećava do 7. dana nakon reperfuzije

Mitohondrije su uključene i u apoptozu i nekrozu što zavisi od jačine oštećenja i prirode signalnih puteva (Saito i sar., 2005).

#### 1.1.4. Ćelijska smrt

Karakterizacija puteva ćelijske smrti u uslovima moždane ishemije je od velike važnosti za razvoj efektivne terapije. Tradicionalno, ćelijska smrt nakon moždane ishemije je razmatrana kao nekrotična po prirodi, ali su istraživači u protekloj deceniji otkrili da to shvatanje nije striktno (Mehta, 2007).

U poslednje dve decenije ćelijska smrt se konvencionalno deli na apoptozu i nekrozu koje se razlikuju morfološki i biohemijski (Gerschenson i Rotello, 1992; Martin i sar., 1998; tabela 1.). Fiziološka ili programirana ćelijska smrt (apoptoza) je indukovana unutrašnjim ćelijskim faktorima, ali postoji mogućnost i egzogene modulacije. Nasuprot tome, patološka ćelijska smrt (nekroza) je rezultat spoljašnjih „napada“ na ćeliju (trauma, osmotski, termički i toksični šok). Proces ćelijske nekroze uključuje narušavanje funkcionalnog i strukturalnog integriteta membrane, brzi ulazak  $\text{Ca}^{2+}$  i vode. Stoga, ćelijska nekroza nije indukovana unutrašnjim ćelijskim faktorima, kao što je slučaj u apoptozi, već snažnim narušavanjem sredine i fizioloških uslova. Ćelijska nekroza nastaje usled narušavanja ćelijske homeostaze, lize membrane, inflamacije, vaskularnog oštećenja i formiranja edema u uslovima izlaganja toksinima, hipoksiji/ishemiji i traumi. Događaji koji vode ka ćelijskoj nekrozi su promene u homeostazi ćelijskog volumena, mitohondrijalne funkcije i membranske propustljivosti, oštećenja u proteinima jonskog transporta, otežana oksidativna fosforilacija i gubitak visokoenergetskih fosfata. Održavanje funkcije mitohondrija je verovatno kritičan faktor koji određuje stepen i progresiju neuronske povrede koja nastaje usled ekscitotoksičnosti.

Nedostatak ovakve binarne podele leži u teškoćama klasifikovanja ćelijske smrti koja nije potpuno ni apoptotska ni nekrotična već pre hibridna forma ćelijske smrti koja se nalazi između ova dva ekstrema. Ove moguće prelazne forme ćelijske smrti se mogu javiti u slučaju degenerišućih neurona gde striktno razlike između apoptoze i nekroze postaju manje jasne. Koncept apoptoza-nekroza kontinuuma ćelijske smrti je formulisan na osnovu otkrića da morfološki fenotip ekscitotoksične ćelijske smrti postoji kao gradijent između dva osnovna oblika nezavisno od karakteristika fragmentacije DNK.

**Tabela 1.** Karakteristike apoptoze, nekroze i nekroptoze. Preuzeto iz Mehta (2007).

Karakteristike		Apoptoza	Nekroza	Nekroptoza
Morfološke	Ćelija	Skupljanje	Oticanje/bubrenje	Izmešane karakteristike nekroze i apoptoze
	Ćelijska fragmentacija	Da (apoptotska tela)	Ne (liza)	
	Jedro	Marginacija hromatina	Piknoza	Kondenzacija
	Integritet membrane	Očuvan	Rano kompromitovan	Gubitak integriteta
	Mitohondrije	Ultrastrukturno normalne	Oticanje	Oticanje
Biohemijske	DNK	Internukleozomalno isecanje	Nasumična degradacija	?
	Fosfatidil serin (FS)	Okrenut ka spoljašnjoj membrani	Eksternalizacija fosfatidil serina	?
Reakcija ćelije	Inflamacija	Nema je (FS privlače makrofage)	Da	Autofagno čišćenje ćelijskih ostataka
	Obrazac	Pogođene individualne ćelije	Više ćelija pogođeno	

*In vivo* morfološke karakteristike ekscitotoksičnosti, za koju se zna da je karakteristika moždane ishemije, u mnogim neuronima uključuju

somatodendritsko oticanje, kondenzaciju hromatina u nepravilna klupka i oštećenje organela tj. promene karakteristične za nekrozu. U drugim neuronima ekscitotoksičnost uzrokuje citološke promene koje više podsećaju na apoptozu. Ekscitotoksična neurodegeneracija *in vivo* može biti i osetljiva i neosetljiva na inhibiciju sinteze proteina, tako da uloga *de novo* sinteze proteina u ekspresiji kaskade odložene ćelijske smrti u ekscitotoksičnosti nije sasvim sigurna. Mehanizmi kojima prolazna moždana ishemija dovodi do ireverzibilne smrti neurona nisu potpuno razjašnjeni i sve su veći naponi za objašnjenje doprinosa odložene ćelijske smrti neurodegeneraciji u ishemiji. U prilog ovome je i otkriće da je degeneracija CA1 piramidalnih neurona u hipokampusu odložena nakon globalne moždane ishemije (Sugawara i sar., 1999). Osnovna pretpostavka je da su neki aktivni mehanizmi ćelijske smrti uključeni tokom vremenskog kašnjenja između početnog oštećenja i krajnje degeneracije CA1 neurona. Izraz odložena ćelijska smrt, u postishemijskoj degeneraciji CA1 neurona, je relativan i zavisi od jačine moždane ishemije. Oštećenje citoskeleta se javlja rano nakon ishemije naročito u dendritima i to pre degeneracije ćelijskih tela. Apoptoza je uočena u nekim grupama neurona za koje se obično ne smatra da su selektivno osetljivi na ishemiju, kao što su granularne ćelije u dentatnom girusu, podgrupa granularnih ćelija u kori velikog mozga i određeni neuroni u talamičkim jedrima. Perivaskularne i parenhimalne neneuronske ćelije takođe umiru apoptozom. Ove neneuronske ćelije su najverovatnije inflamatorne ćelije, kao što su leukociti i makrofagi, koje krvotokom dospevaju u područja sa neuronskim oštećenjem. Uočene razlike između morfoloških karakteristika nekroze i DNK fragmentacije karakteristične za apoptozu tokom ishemijske neurodegeneracije mogu imati par objašnjenja. Internukleozomalna DNK fragmentacija se može javiti u *in vitro* modelima ćelijske smrti izazvane  $Ca^{2+}$  sa ultrastrukturnim karakteristikama nekroze i usled ekscitotoksičnosti izazvane aktivacijom NMDA receptora. Ovo je sve u skladu sa poznatom funkcijom  $Ca^{2+}$

u aktivaciji nekih endonukleaza odgovornih za fragmentisanje DNK. (Martin i sar., 1998).

### 1.1.5. Inflamacija

Inflamatorni događaji koji su započeti na krvnim sudovima se javljaju par sati nakon ishemije i leže u osnovi prelaska ishemične u inflamacijsku povredu. Glavni učesnici u inflamatornoj povredi su citokini (interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), faktor nekroze tumora („tumor necrosis factor“  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) i faktor rasta tumora („tumor growth factor“  $\beta$  (TGF- $\beta$ )), adhezioni molekuli (selektini, integrini i imunoglobulini), eikozanoidi i iNOS, koji se proizvode neposredno nakon ishemije i doprinose ireverzibilnom oštećenju. Ove molekule proizvode endotelijalne ćelije, astrociti, mikroglialne ćelije i leukociti (granulociti, monociti-magrofagi, limfociti). Moždana ishemija dovodi do infiltracije inflamatornih ćelija iz nespecifične imunološke reakcije, migracije perifernih leukocita u mozak i aktivacije mikroglije (Zheng i sar., 2003; Šekeljić i sar., 2011). Oslobođanje inflamatornih citokina od strane ishemičnih neurona i glije dovodi do stvaranja adhezivnih molekula (selektina, integrina, intercelularni adhezivni molekul 1) (Selaković i sar., 2009) u moždanoj vaskulaturi što rezultuje narušavanjem KMB kulminirajući u formiranju edema (Han i Yenari, 2003). Pojačana sekrecija citokina i proteaza, kao što su matriksne metaloproteinaze, uzrokuje dalji poremećaj u vanćelijskom matriksu i KMB (Harukuni, 2006).

Makrofagi i monociti, nakon neutrofila migriraju u ishemični deo mozga i postaju predominantne ćelije 5-7 dana nakon ishemije (Stoll i sar., 1998). Hemokini, npr. IL-8, monocit hemoatraktant protein 1, proizvedeni u ishemičnom mozgu stimulišu migraciju inflamatornih ćelija iz krvi na mesto lezije. Rezydentne ćelije su takođe uključene u inflamatorni odgovor. Astrociti

postaju hipertrofirani, dok mikroglijalne ćelije povlače svoje nastavke i zadobijaju ameboidnu morfologiju 4-6 h nakon moždane ishemije. Broj granulocita dostiže maksimum 24 h nakon ishemijske povrede, zatim naglo pada i 7. dana se tek ponegde pojavljuju. Postoje dokazi da intravaskularna akumulacija granulocita redukuje protok krvi tokom reperfuzije i tako doprinosi veličini povrede (Wen, 2006).

Iako inflamacija doprinosi ishemijskoj povredi, efekat individualnih komponenti inflamatorne kaskade može biti koristan u zavisnosti od stepena povrede tkiva, jačine odgovora i da li inflamatorne komponente aktiviraju neuroprotektivne puteve (Bruce i sar., 1996; Yhang i sar., 2000).

Jedan od najranijih inflamatornih odgovora na moždani udar identifikovan kod pacijenata je povećanje broja perifernih limfocita (Selaković i sar., 2009). Neutrofili su prvi limfociti koji odgovaraju na povredu i njihov broj koreliše sa volumenom infarkta (Emsley i sar., 2003). Povećanje nivoa cirkulišućih monocita je takođe opaženo, ali se dešava posle odgovora neutrofila, obično 3 dana nakon moždanog udara (Kochanek i Hallenbeck, 1992).

#### **1.1.6. Neurovaskularne promene**

Neurovaskularna jedinica koju formira mikrovaskularni endotelijum (astrociti, neuroni i ekstraćelijski matriks) je esencijalna za normalno funkcionisanje mozga. Kompleksna i dinamična interakcija između ovih komponenti na mestu gde se susiće krv-sudovi-parenhim nakon moždane ishemije određuju veličinu krajnjeg neuronskog oštećenja. Metabolizam nervne ćelije je pod uticajem okružujućih ćelija (glijalnih i endotelijalnih) kroz dve anatomske i funkcionalne barijere - KMB i bazalne lamine za transmigraciju cirkulišućih krvnih ćelija, koje predstavljaju selektivni filter za njihov transport.

Moždana ishemija ima za posledicu razaranje KMB, dovodeći do narušavanja endotelijalnih tesnih veza (Mark i Davis, 2002) i degradacije bazalne lamine (Gidday i sar., 2005). Moguće je da degradacija zavisi od matriksnih metaloproteinaza. U moždanoj ishemiji, MMP2 i MMP9 su uključene u ovaj proces što rezultuje u gubljenju kontakta između astrocita i endotelijalnih ćelija i hemoragične transformacije (Fukuda i sar., 2004). Nivo ovih MMP se podiže u roku od nekoliko sati nakon moždane ishemije i hemoragičnog udara kako u eksperimentalnim modelima tako i u mozgu čoveka (Machado i sar., 2006; Rosell i sar., 2006). Promene u integritetu KMB izazvane moždanom ishemijom iniciraju infiltraciju i akumulaciju leukocita, adheziju i transmigraciju, dok integrini strukturno modifikuju bazalnu laminu i vanćelijski matriks. Sve ovo dalje dovodi do aktivacije inflamatorne kaskade koja vodi daljem oštećenju mozga (Huang i sar., 2006).

### **1.1.7. Aktivacija glijalnih ćelija**

#### **1.1.7.1. Astrociti**

Astrociti su najbrojnije neneuronske ćelije u centralnom nervnom sistemu (CNS) i čine oko 50 % volumena ljudskog mozga (Tower i Young, 1973). Astrociti imaju nekoliko funkcija koje su esencijalne za funkcionisanje nervne ćelije, uključujući izrastanje neurita, preuzimanje i otpuštanje glutamata, odstranjivanje viška  $K^+$ , održavanje stalne pH vrednosti (puferski sistem) i transport vode. Astrociti se dele na 3 glavna tipa ćelija na osnovu morfologije i prostorne organizacije: radijalne koji okružuju komore, protoplazmatične u sivoj masi i fibrozne u beloj masi (Privat i sar., 1995). Radijalni astrociti su orijentisani perpendikularno na površinu komora i imaju duge negranate nastavke. Protoplazmatični astrociti imaju žbunastu morfologiju sa brojnim

visokogranatim kratkim nastavcima. Fibrozni astrociti pokazuju više zvezdasti oblik sa glatkim, dugim nastavcima koji su manje granati. Glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP) i S-100beta (citosolni  $\text{Ca}^{2+}$  vezujući protein) se često koriste kao markeri astrocita. GFAP je za astrocite specifični intermedijerni filamentni protein čija ekspresija je neophodna za funkciju fibroznih astrocita, uključujući održavanje integriteta bele mase u CNS i KMB. Većina protoplazmatičnih astrocita ne ekspresira dovoljno GFAP kako bi se pozitivno obojili rutinskim imunohistochemijskim metodama (Walz, 2000).

Astrociti su vrlo bitni za preživljavanje neurona u uslovima moždane ishemije i kod drugih povreda mozga. Nakon par sati, prilikom bilo koje povrede mozga, preživeli astrociti u pogođenom regionu postaju hipertrofirani i proliferišu. Ovaj proces se naziva reaktivna astroglia (Ridet i sar., 1997). Ovaj odgovor je pojačan migracijom mikroglije i makrofaga na oštećeno područje. Reaktivni astrociti povećavaju ekspresiju svojih strukturnih proteina tj. GFAP i vimentina. Cu,ZnSOD, glutation peroksidaze i metalotionein su povećani u reaktivnim astrocitima nakon moždane ishemije (Liu i sar., 1993; Campagne i sar., 2000) što ukazuje na veći antioksidativni potencijal. Astrociti mogu da ekspresiraju iNOS i citokine. Reaktivni astrociti sintetišu kolagen i sulfatne proteoglikane koji takođe ometaju rast neurita. Oni proizvode i matriksne metaloproteinaze i njihove inhibitore koji su uključeni u remodelovanje vanćelijskih komponenti matriksa i promovišu obnavljanje KMB kroz produkciju komponenti vanćelijskog matriksa. Astrociti otpuštaju trofičke faktore - nervni faktor rasta (NGF), fibroblastni faktor rasta (FGF), transformišući faktor rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) i moždani neurotrofički faktor (BDNF).

Odgovor astrocita može biti trenutni (neposredno utiče na ćelijsko preživljavanje) i dugotrajan ili odložen (utiče na kasniji oporavak i funkciju). Neuroni ne mogu preživeti u mozgu bez bliskog kontakta sa astrocitima. U bilo kom regionu mozga gde astrociti ne uspeju da prežive, nužno dolazi i do smrti

neurona bez mogućnosti sinaptičkog remodelovanja. U regionima gde prežive, postoji mogućnost sinaptičkog remodelovanja i izrastanja neurona kako bi se kompenzovao gubitak neurona. Usled drugačijeg metabolizma glukoze i veće mogućnosti antioksidativne zaštite, astrociti su generalno manje osetljivi na ishemiju i druge stresore nego neuroni. Glutamatna toksičnost je važan mehanizam neuronalne smrti u ishemiji, hipoglikemiji i traumi (Choi, 1998). Uklanjanje glutamata iz vanćelijskog prostora se vrši prvenstveno  $\text{Na}^+$  zavisnim transporterima lokalizovanim na astrocitima. Brojne studije potvrđuju esencijalnu ulogu astrocitnog glutamatnog transportera u održavanju koncentracije vanćelijskog glutamata ispod toksičnog nivoa. Astrociti sadrže višu količinu glutationa i enzima uključenih u metabolizam glutationa nego neuroni, tako da su sposobniji za uklanjanje ROS i na taj način podržavaju preživljavanje neurona. Povećanje vanćelijskog  $\text{K}^+$  tokom ishemije može doprineti oticanju ćelije, oslobađanju glutamata i anoksičnim depolarizacijama. Astrociti imaju i aktivan i pasivan način ograničavanja povećanja vanćelijskog  $\text{K}^+$  (Walz i Hertz, 1983). Primarni uzrok acidoze tokom ishemije je produkcija mlečne kiseline u glikolitičkoj produkciji ATP. Iako astrociti aktivno uklanjaju  $\text{H}^+$  raznim mehanizmima i na taj način redukuju acidifikaciju vanćelijskog prostora, nije poznato da li ti aktivni mehanizmi mogu funkcionisati u toku ishemije.

Edem mozga može doprineti povredi nakon moždane ishemije sprečavajući lokalni ili globalni moždani krvotok i fizički prekidajući duge fibrozne puteve. Edem mozga se može klasifikovati na vazogeni usled transkapilarnog pomeranja vode i rastvora kroz KMB i citotoksični usled osmotskog oticanja ćelijskih elemenata. Astrociti imaju ulogu u oba ova procesa. Završeci astrocita pokrivaju veliku abluminalnu površinu kapilara i na taj način fizički formiraju deo KMB.

### 1.1.7.2. Mikroglia

Mikroglialne ćelije imaju kritičnu ulogu kao rezidentne imunokompetentne i fagocitotske ćelije u CNS i služe za uklanjanje ćelija na mestu infekcije, inflamacije, traume, ishemije i neurodegeneracije (Kim i Jean de Vellis, 2005). Na osnovu klasičnih morfoloških studija baziranih na bojenju srebrom, mikroglialne ćelije su podeljene na: ameboidne, ramifikovane i intermedijerne (del Rio Hortega, 1932).

Nedavno je usvojena slična klasifikacija mikroglialnih ćelija kako bi se opisao stepen njihove aktivacije na: mirujuća, aktivirana i ameboidna fagocitna mikroglia (Streit i sar., 1989). U CNS razgranata mirujuća mikroglia čini 5-20 % neuroglialne populacije, ima je više u sivoj masi i modifikuje svoju morfologiju i ekspresiju površinskih ćelijskih antigena na osnovu svog okruženja (Lawson i sar., 1992). Mikroglia je imuni efektor u CNS i kao takva odgovara na bilo kakve patološke uslove, uključujući aktivaciju imunog sistema. One eksprimiraju fenotipske markere monocit-makrofag linije i predstavljaju antigen prezentujuće ćelije u CNS. Mikroglije proizvode citokine, hemokine i neurotrofičke molekule.

U toku razvika mozga mikroglije imaju morfologiju sličnu makrofagima sa relativno velikim ćelijskim telom i kratkim nastavcima i opšti naziv za takvu mikrogliju je ameboidna. Osnovna funkcija ameboidne mikroglije je fagocitoza mrtvih ili umirućih ćelija uključujući neurone koji podležu apoptozi u kasnom embrionskom ili ranom postnatalnom stupnju. Kako se mozak razvija broj ameboidnih mikroglia se smanjuje i zamenjuje povećanim brojem ramifikovane, sa malim telima i dugim razgranatim nastavcima. Ramifikovana mikroglia se smatra funkcionalno neaktivnom ili u stanju mirovanja i zove se mirujuća mikroglia. Kada je mozak oštećen ili kad je u pitanju neko oboljenje mozga, ramifikovana mikroglia se transformiše u aktiviranu mikrogliju tj.

reaktivnu mikrogliju koja ima skraćene nastavke, uvećano ćelijsko telo i proliferiše na mestu povrede. Ova transformisana mikroglia je funkcionalno aktivna i uključena je u mnoge patološke procese. Postoji nekoliko vrsta stimulusa koji mogu aktivirati mikroglialne ćelije. Jednu kategoriju predstavljaju promene u naelektrisanju nastale usled povrede neurona i promene u jonskom miljeu oko povređenih neurona. Druga kategorija su biološki aktivne supstance koje uključuju peptide i hormone male molekularne mase. Faktori rasta i citokini mogu takođe aktivirati mikrogliju. Među citokinima je i faktor stimulacije kolonije (CSF), koji je neophodan za njenu proliferaciju. Aktivirana mikroglia stvara nekoliko potencijalno citotoksičnih molekula uključujući superoksidni anjon, NO i proinflamatorne citokine. Pored toga, eikozanoidi, vazoaktivni histamin ili ekscitotoksični glutamat nastali u mikrogliji mogu promovisati degenerativne procese i inflamaciju. Aktivirana mikroglia sintetisuje neurotrofičke faktore kao što su neurotrofini (NT3, NT4), faktor rasta neurona (NGF), moždani neurotrofički faktor („brain derived neurotrophic factor“ (BDNF)), TGF- $\beta$ , IL6, fibroblastni faktor rasta 2 (FGF) (Nakajima i Kohsaka, 2001).

#### **1.1.8. Promene u ponašanju**

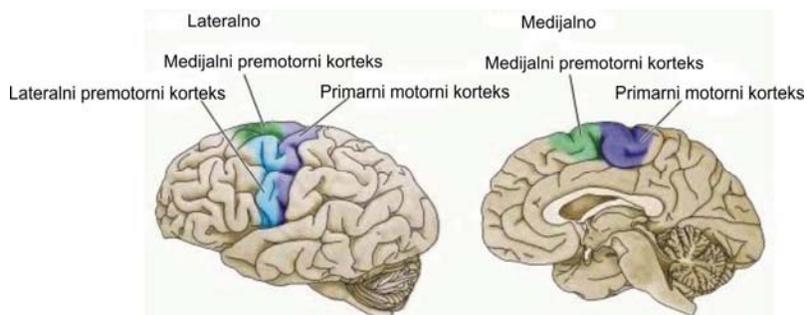
Postoji dosta literaturnih podataka o uticaju globalne moždane ishemije na ponašanje glodara koji ukazuju na sličnost sa primatima uključujući ljude (Zola-Morgan i sar., 1986, Rempel-Clower i sar., 1996). Neposredno nakon ishemije, životinje ispoljavaju promene u ponašanju koje se često koriste kao neurološki marker efektivnosti ishemije.

### 1.1.8.1. Motorna aktivnost

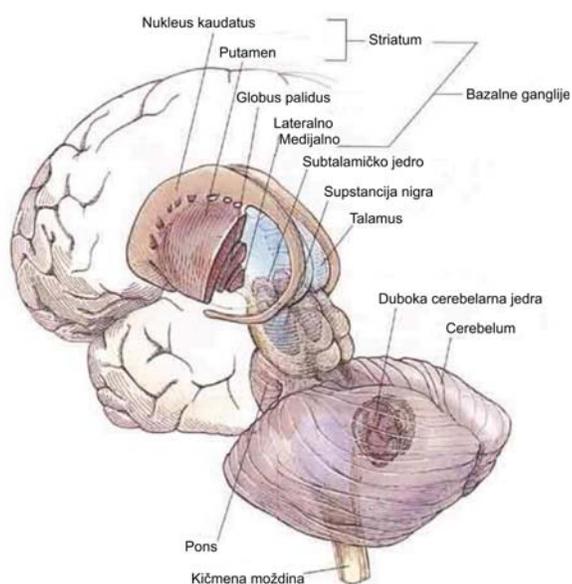
Procena lokomotorne aktivnosti je jedan od najčešćih testova ponašanja nakon moždane ishemije kod glodara. Pacovi, kao i pustinjski miševi, pokazuju povećanu lokomotornu aktivnost u testu otvorenog polja -„open field“ testu nakon ishemije što se interpretira kao poremećaj habituacije (Wang i Corbett, 1990). Poznato je da hipokampus ima ulogu u kontroli lokomotorne aktivnosti kroz veze sa *nucleus accumbens* (Yang i Mogenson, 1985). Postoje dve faze koje prate bilateralnu globalnu ishemiju: period imobilnosti (1) praćen povećanjem aktivnosti iznad normalnih vrednosti (2). Prva faza je uočljiva nakon povratka svesti i refleksa, obično 30 min do par sati nakon ishemije (Kirino i sar., 1980; Warner i sar., 1991). Nakon neaktivne faze sledi period intenzivne lokomotorne aktivnosti u trajanju od nekoliko sati do nekoliko dana u zavisnosti od jačine moždanog udara (Corbett i Nurse, 1998; Janać i sar., 2006).

### 1.1.9. Strukture uključene u kontrolu motorne aktivnosti

Strukture CNS uključene u kontrolu motorne aktivnosti su motorne zone kore velikog mozga, moždano stablo (produžena moždina, pons i srednji mozak), bazalne ganglije, cerebelum i kičmena moždina (slika 5.). Od pojedinih zona kore velikog mozga, uključujući primarnu motornu zonu (4. Brodmanovo polje, neposredno ispred centralne brazde), premotornu i suplementarnu motornu zonu, zavisi voljno, naučeno kretanje. Posteriorni parijetalni korteks (polja 5 i 7) takođe ima uticaja na voljne pokrete (slika 6.).



**Slika 5.** Primarni motorni korteks i premotorna oblast kod ljudi (predstavljene lateralno (A) i medijalno (B)). Primarni motorni korteks je lociran u precentralnom girusu; premotorna oblast je više rostralno.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10962/figure/A1163/?report=objectonly>



**Slika 6.** Strukture CNS uključene u kontrolu motorne aktivnosti

### 1.1.9.1. Bazalne ganglije

Postoji nekoliko jedara koji grade bazalne ganglije (BG). Većina se projektuje na druga jedra unutar BG stvarajući veliku subkortikalnu mrežu unutar prednjeg mozga. Dva izlazna jedra BG su globus pallidus (*globus pallidus*) interni segment (GPI) i supstancija nigra pars reticulata (*substantia nigra pars reticulata* (SNr)) dok glavni ulaz u jedra predstavlja striatum (*striatum*) koga čine

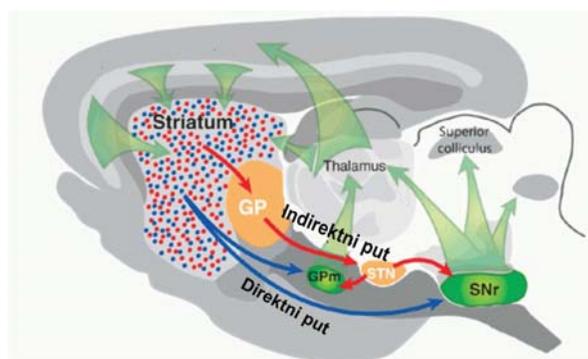
repatu jedro (*nucleus caudatus*) i putamen (*putamen*). Subtalamička jedra (STN) se mogu takođe smatrati kao ulazna jedra zato što, kao i striatum, STN primaju direktne ulaze iz kore velikog mozga (Kitai, 1981; Nambu i sar., 2002). Kroz dva izlazna jedra BG inervišu samo tri strukture – talamus (*thalamus*), superior kolikulus (*superior colliculus*) i pedunkulopontinsko jedro (*pedunculopontine nucleus*) (PPN). Iako je njihov uticaj posredovan kroz samo 3 ciljne strukture, uticaj BG je daleko veći. Kroz talamus utiče na obradu motornih, senzornih i kognitivnih informacija u kori velikog mozga (Hoover i Strick, 1999). Kroz superior kolikulus utiču na pokrete glave i očiju (Hikosaka i sar., 2000). Kroz PPN utiču na procese u kičmenoj moždini i aspekte lokomocije i posturalne kontrole (Takakusaki i sar., 2003). Za razliku od malog broja eferentnih projekcija, aferentne projekcije u BG dolaze praktično iz svih oblasti kore velikog mozga tako da BG imaju veliki uticaj na mnoge nervne puteve i sisteme za prenos informacija.

Striatum je glavna ulazna struktura BG i sastoji se od dva funkcionalno slična jedra - kaudatusa i putamena. Striatum prima ekscitatorne projekcije iz različitih oblasti kore velikog mozga (Kemp i Powell, 1970) i talamičkih jedara (Smith i sar., 2004). Kao rezultat interakcija kora velikog mozga - BG može se identifikovati pet paralelnih puteva za prenos informacija - motorni put, okulomotorni, dorzolateralnoprefrontalni, lateralno orbitofrontalni i prednji cingulatni put (Alexander i sar., 1986). Osnovni tip neurona u striatumu su srednji trnoliki projekcioni neuroni (Bishop i sar., 1982; Wilson i Groves, 1980), koji čine 95 % populacije neurona i na koje stižu glavne aferentne projekcije iz kore velikog mozga. Preostali neuroni su interneuroni i njihovi aksoni se jako retko projektuju van striatuma. Među njima se mogu razlikovati jasno morfološki i neurohemijski definisani tipovi. Veliki netrnloliki neuroni koji koriste acetilholin (Bolam i sar., 1984) i srednji netrnloliki neuroni koji koriste GABA kao neurotransmitter (Kita i Kitai, 1988).

Na striatum se projektuju i dopaminergički neuroni locirani u ventralnom srednjem mozgu. Dopaminergička inervacija striatuma potiče iz dva jedra, *substantia nigra-pars compacta* (SNc) i ventralne tegmentalne oblasti (VTA). Dopamin (DA) koji stiže iz VTA inerviše caudatus, putamen i ventralni striatum (takođe poznat kao *nucleus accumbens*). Postoje dva tipa DA receptora (D1 i D2) na glavnim striatalnim projekcionim neuronima (srednji trnoliki projekcioni neuroni). Striatalni neuroni koji se projektuju direktno na izlazna jedra BG imaju D1 receptore, dok striatalni neuroni koji se projektuju indirektno kroz druga jedra BG na izlazna jedra imaju D2 receptore na dendritima. Ova dihotomija ukazuje na indirektni put koji inhibira pokrete i direktni koji ih olakšava (slika 7., Gerfen i sar., 1990). U striatumu postoji i dosta vrsta interneurona koji se dele na holinergičke velike negranate neurone poznate kao tonično aktivne neurone zbog svog fiziološkog fenotipa (Bolam i sar., 1984), parvalbumin/GABAergični srednji netrnoliki neuroni (Kita i Kitai, 1988) i somatostatin, neuropeptid Y i NADPH-diaforaze sadržavajući netrnoliki neuroni (Gerfen i Wilson, 1996). Kao i striatum, globus palidus (GP) je podeljen na dva jedra. Više lateralno smešteno jedro predstavlja spoljašnji segment (GPe), dok je medijalno smešteno jedro unutrašnji segment (GPi). Oba segmenta GP primaju GABAergične ulaze iz striatalnih srednje trnolikih projekcionih neurona. Direktni striatalni-GPi put čine srednji trnoliki GABAergični neuroni koji sadrže i supstancu P, dok indirektni striatalno-GPe-STN-GPi put čine srednji trnoliki GABAergični neuroni koji sadrže enkefalin (Gerfen i Wilson, 1996; slika 7.). STN leži ventralno od talamusa. Tradicionalno, anatomsko pozicija STN u BG je u okviru indirektnog puta. Projekcije od STN su jedine ekscitatorne projekcije u BG (Kitai i Deniau, 1981).

Striatum sadrži dva jasno odvojena kompartmana - matriks i „patch“ (striozomi) koji se mogu definisati na osnovi brojnih neurohemijskih markera, a morfološka osnova razlika su ulazne i izlazne projekcije. Matriksni i „patch“

neuroni su fizički odvojeni, tako recimo dendriti „patch“ i matriks neurona ostaju u okviru svojih kompartmana. „Patch“ i matriksni odeljci obezbeđuju odvojene puteve iz različitih populacija kortikostriatalnih neurona kroz striatum koji različito pogađaju izlazne neurone bazalnih ganglija i nigrostriatni dopaminski povratni sistem (Gerfen, 2004).



**Slika 7.** Direktni i indirektni put bazalnih ganglija. Sagitalni pogled na mišiji mozak Plavo - direktni put; crveno - indirektni put. Gpm-medialni *globus pallidus*, SNr-*substantia nigra pars reticulata*, GP-*globus pallidus*, STN- subtalamičko jedro. Gerfen, 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2724179/figure/F1/>

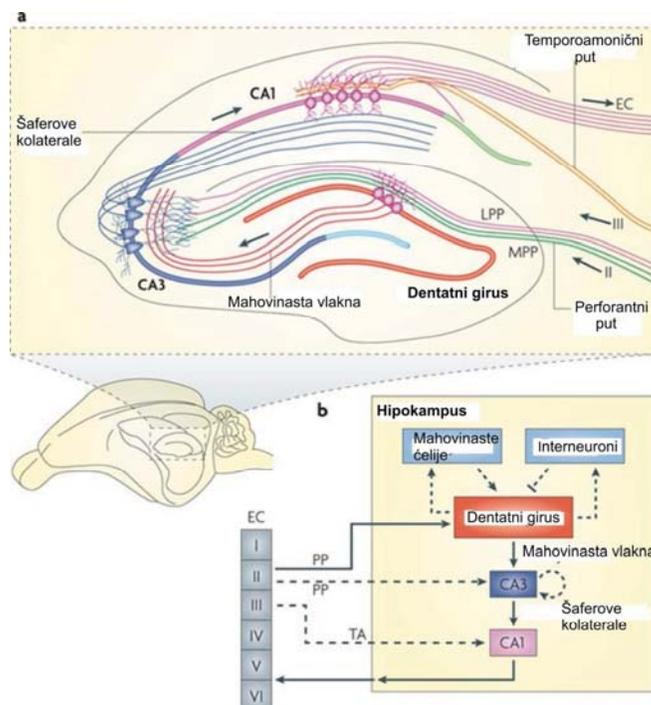
### 1.1.9.2. Hipokampus

Hipokampus se sastoji od dva seta kortikalnih struktura, hipokampalne formacije i parahipokampalnog regiona (Witter i Amaral, 1991). Glavne razlike su broj kortikalnih slojeva i opšti principi povezanosti. Hipokampalnu formaciju čine tri citoarhitektonski različita regiona: dentatni girus (DG), hipokampus (ili hipokampus proper) koji je podeljen na tri polja (CA3, CA2 i CA1) i subikulum (slika 8.). Sva tri hipokampalna regiona dele karakterističnu troslojnost koja se naziva alokorteks. Njihova povezanost je uglavnom unidirekcionalna (slika 9.). Granularne ćelije DG se projektuju preko odvojenih mahovinastih vlakana na CA3 polja hipokampusa. Iako neke CA3 ćelije šalju svoje aksonske kolaterale na polimorfne slojeve DG, one ne inervišu granularne

ćelije. Slični unidirekcionni obrasci postoje i za ostale glavne unutrašnje (CA3 do CA1; CA1 do subikuluma) hipokampalne formacije. Aksoni entorinalnog korteksa se projektuju na DG kroz tzv. perforantni put. Entorinalni korteks uključujući peririnalni i postrinalni korteks čine parahipokampalni region. Parahipokampalni region uključuje i presubikulum i parasubikulum. DG čini sloj relativno bez ćelija koji se zove molekularni sloj; granularni ćelijski sloj koji leži duboko ispod molekularnog sloja i građen je primarno od gusto pakovanih granularnih ćelija koje se nalaze u kolumnama i polimorfnog ćelijskog sloja (termin hilus se često upotrebljava kao sinonim za ovaj sloj). Od granularnih ćelija polaze nemijelizovani aksoni koje je Ramony Cajal nazvao mahovinasta vlakna i svako vlakno se grana na otprilike 7 tanjih kolaterala u okviru polimorfnog sloja pre ulaska u CA3 polje hipokampususa. Postoje razne basketne (košaraste) ćelije locirane blizu granularnog sloja. Krajevi u ovom košarastom sloju su GABAergični i formiraju inhibitorne kontakte sa ćelijskim telima i apikalnim dendritima granularnih ćelija. Glavni ulaz u DG je iz entorinalnog korteksa i DG ne prima više nikakve direktne veze iz drugih kortikalnih struktura, a subkortikalni ulazi su iz septalnih jedara, supramamilarnog regiona posteriornog hipotalamusa i iz nekoliko monoaminergičnih jedara moždanog stabla naročito lokus ceruleusa (*locus coeruleus*) i nukleus rafe (*nucleus raphe*) (Witter i Amaral, 1991).

Hipokampus proper se deli na CA1, CA2 i CA3. Osnovni ćelijski sloj je piramidalni sloj. Uzan sloj, relativno bez ćelija je lociran duboko u odnosu na piramidalni sloj i zove se stratum oriens i duboko u odnosu na to su alveusi koji sadrže vlakna. U CA3 regionu ali ne i CA2 i CA1, uzana acelularna zona locirana upravo iznad piramidalnog ćelijskog sloja je okupirana aksonima mahovinastih vlakana koji polaze iz DG. Ovaj uzan sloj se zove stratum lucidum. Iznad stratum luciduma u CA3 i odmah ispod piramidalnog sloja u CA2 i CA1 regionima je stratum radiatum. Deo hipokampususa koji se nalazi na





**Slika 9.** Neuronalni putevi u hipokampusu glodara. a | Ilustracija hipokampalnog kruga. b | Dijagram hipokampalne mreže neurona. Klasični ekscitatorni trisinaptički put (entorinalni korteks (EC)–dentatni girus (DG)–CA3–CA1–EC) je označen punim strelicama; perforantni put (PP), lateralni perforantni put (LPP), medijalni perforantni put (MPP), temporoamonični put (TA).

[http://www.nature.com/jcbfm/journal/v31/n5/fig\\_tab/jcbfm201124f1.html](http://www.nature.com/jcbfm/journal/v31/n5/fig_tab/jcbfm201124f1.html)

## 1.2. ELEKTROMAGNETNA POLJA - EKOLOŠKI FAKTOR I TERAPIJSKO SREDSTVO

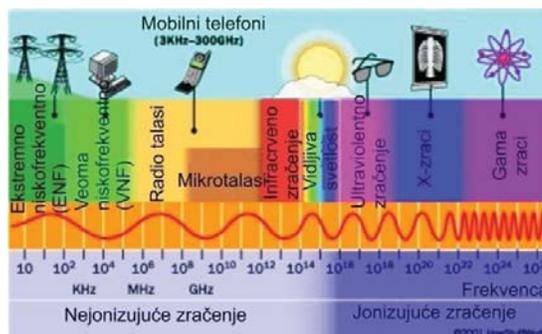
### 1.2.1. Poreklo i karakteristike

Poslednjih decenija intenzivno se razvija oblast biologije koja se naziva magnetobiologija, čiji je zadatak ispitivanje efekata elektromagnetnih polja (EMP) na žive sisteme i razumevanje mehanizama na kojima se oni zasnivaju.

Uzrok sve veće zainteresovanosti za istraživanja ovog tipa je povećano prisustvo veštačkih izvora EMP i njihovo stalno dejstvo na žive sisteme. Dakle, pored geomagnetnog polja ili magnetnog polja Zemlje (jačine od 20 do 70  $\mu\text{T}$ ), postoje i EMP koja stvaraju veštački izvori kao što su električni vodovi i uređaji kojima smo okruženi u domaćinstvu i na poslu. Električni uređaji u domaćinstvu generišu EMP jačine od 0,1 do 100  $\mu\text{T}$ , ali zbog karakteristika EMP da njihova jačina naglo slabi sa udaljavanjem od izvora, ona se gotovo ne mogu ni detektovati ako smo od izvora udaljeni 1 metar. Bez obzira na ovu njihovu osobinu dejstva EMP na žive sisteme nisu zanemarljiva. Sve je više podataka kako o štetnom tako i o korisnom dejstvu ovih polja.

EMP je oblik energije emitovan od strane naelektrisane čestice i ima karakteristike talasa. EMP ima i električnu i magnetnu komponentu koje osciliraju u fazama normalno jedna na drugu i normalno na pravac prostiranja talasa (slika 11). U vakuumu EMP se prostire brzinom svetlosti.

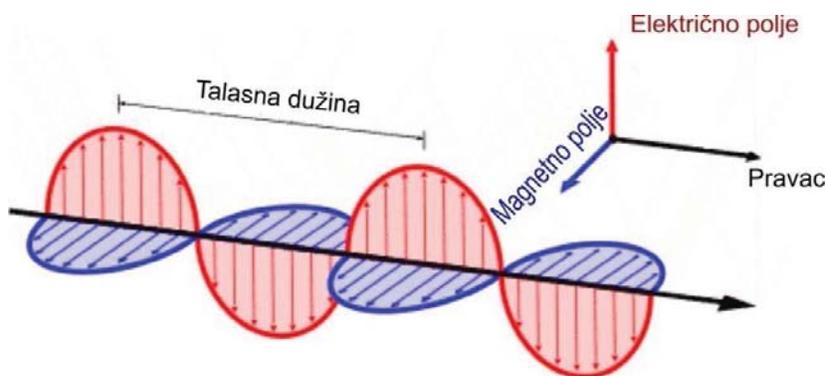
U klasičnoj fizici, EMP se posmatra kao talas koji nastaje kada se naelektrisane čestice ubrzavaju uz pomoć sila koje deluju na njih. Elektroni su odgovorni za emisiju većine EMP zbog toga što su male mase i stoga se lako ubrzavaju raznim mehanizmima. EMP se klasifikuju na osnovu frekvencije, odnosno talasne dužine (slika 10). Živi svet je u mogućnosti da vizuelno detektuje samo mali deo spektra (400-700 nm) koji se naziva vidljiva svetlost. Efekti EMP na biološke sisteme zavise od emitovane energije, koja je direktno proporcionalna frekvenciji. EMP niske frekvencije imaju malu energiju i stoga, osim efekta povećanja temperature ne oštećuju ćelije, tkiva i materijale. EMP visoke frekvencije se nazivaju i jonizujuća jer osim zagrevanja mogu i da oštete individualne molekule tj da ih jonizuju.



Slika 10. Elektromagnetni spektar

<http://electronics.howstuffworks.com/cell-phone-radiation1.htm>

U delu spektra ispod 100 kHz električno i magnetno polje se posmatraju kao zasebne komponente tj odvojena i spora, vremenski varirajuća polja (Deno i Carpenter, 1994). Magnetna polja mogu biti konstantna i promenljiva u zavisnosti da li nastaju pod dejstvom jednosmerne ili struje promenljivog smera. Pored frekvencije, veličine koje opisuju magnetno polje su magnetna indukcija (B) i intenzitet magnetnog polja (H). SI jedinica magnetne indukcije je Tesla (T), a u upotrebi je i Gaus ( $1 \text{ T} = 10^4 \text{ G}$ ). Jedinica intenziteta magnetnog polja je amper/metar (A/m) ili Ersted (Oe).



**Slika 11.** Prostiranje elektromagnetnog talasa. Elektromagnetni talas se može predstaviti kao samopropagirajući transferzalno oscilujući talas električnog i magnetnog polja. Ovaj dijagram pokazuje ravan linearno polarizovanog talasa koji se prostire sa leva na desno. Električno polje je u vertikalnoj ravni, a magnetno polje u horizontalnoj ravni. [http://www.srh.noaa.gov/jetstream/remote/remote\\_intro.htm](http://www.srh.noaa.gov/jetstream/remote/remote_intro.htm)

### 1.2.2. Interakcija sa biološkim sistemima

Stalno povećanje upotrebe električne energije u svim industrijalizovanim društvima je značajno povećalo prisustvo EMP, uključujući i ekstremno niskofrekventna (ENF, <300 Hz) koja su bila predmet naših istraživanja, u životnoj sredini. Električna i magnetna polja merena ispod električnih dalekovoda (50 Hz) se nalaze obično u opsegu 1-10 kV/m i 1-10  $\mu$ T (ali mogu dostići i vrednosti 11 kV/m i 100  $\mu$ T) i pored ovoga sve prisutnija EMP u domaćinstvima i radnom okruženju (Lacy-Hulbert i sar., 1998).

U ranijim studijama, uočene su sličnosti u određenim odgovorima tkiva, ćelija i subćelijskih frakcija na sredinska ENF polja. Za ova polja predloženi su modeli bazirani na spojenim statičkim i oscilirajućim magnetnim poljima. Oni uključuju jonsku ciklotronsku rezonancu (Liboff, 1992) gde mono- i bivalentni katjoni, kao što su  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$ , preovlađujući joni u ćelijskoj sredini, mogu ispoljiti ciklotronsku rezonancu na ENF u prisustvu ambijentalnog statičkog polja manjeg od 100  $\mu$ T, kao što je geomagnetno polje. Drugi modeli koji opisuju zavisnost od frekvencije se zasnivaju na faznom pomeraju (Lednev, 1991) i jonskoj paramagnetnoj rezonanci (Blanchard i Blackman, 1994), ali interpretacija ovih zavisnosti od frekvencije zasnovanih na jonskoj paramagnetnoj rezonanci ostaju nejasne (Adair, 1998).

Koncept ćelije ističe ulogu membrane, okruženja i organizovane unutrašnjosti koja učestvuje u osnovnim hemijskim procesima, u odgovoru na EMP. Ćelijski agregati koji formiraju tkiva viših životinja su odvojeni uzanim kanalima u kojima se nalazi međućelijska tečnost koja je od velike važnosti za međućelijsku komunikaciju. Ovi uzani međućelijski prostori uglavnom nisu širi od  $150 \text{ \AA}$  (15 nM) i predstavljaju put za biomolekule da se vežu za svoja mesta na ćelijskim membranama. Mala električna impedanca ih čini preferencijalnim putem u odnosu na transmembranski za indukovane struje unutrašnjih i

sredinskih EMP (Adey, 1992). Iako međućelijski prostori čine svega 10 %, nose najmanje 90 % nametnute ili unutrašnje struje, usmeravajući je duž površine ćelijskih membrana. Iz unutrašnjosti ćelije elektrohemijske „antene“, isturene kao glikoproteinske niti u ove džepove, formiraju glikokaliks. One omogućavaju prvu detekciju slabih elektrohemijskih oscilacija u vanćelijskom fluidu, uključujući potencijale polja nastale aktivnošću susednih ćelija ili kao komponente tkiva sredinskih polja. Postoji i direktna povezanost koneksinima koji stvaraju pukotinaste veze direktno spajajući ćelijske membrane. Iza moguće inicijalne uloge u prenošenju slabog EMP ovim vezama se mogu amplifikovati ćelijski signali kroz visokooperativna vezivanja ili otpuštanja  $\text{Ca}^{2+}$  jona (Bawin i sar., 1975; Blackman i sar., 1985). Elektrostatički faktori, pre nego hemijske interakcije, su uključeni i u regulaciji fluksa  $\text{Na}^+$  i drugih katjona kroz membranske jonske kanale (Lopez, 2003). Ova otkrića podržavaju tvrdnju da su ćelijske membrane put ulazne provodljivosti za  $\text{K}^+$  kao rezultat osnovnih fizioloških ili reakcija na prisustvo magnetnih polja u spoljašnjoj sredini.

Ako bi posmatrali žive organizme na nivou fizičkih procesa na atomskom nivou, pre nego hemijskih reakcija između biomolekula (Adey, 1997) tada bi EMP moglo da reguliše stepen i količinu produkata biohemijske reakcije najverovatnije kroz mehanizam produkcije slobodnih radikala (McLauchlan i Steiner, 1991), uključujući direktan uticaj na aktivnost enzima (Grissom, 1995). Hemijske veze su magnetne veze formirane između susednih atoma kroz sparivanje elektrona suprotnih spinova, koji su na taj način privučene magnetnim silama. Lander (1996) pretpostavlja da se određene aminokiseline proteina na površini ćelija mogu ponašati kao selektivne mete za kiseonične i azotne slobodnoradikalske vrste. Na taj način EMP podešava redoks potencijal molekula ciljnog proteina kao kritičnu determinantu njegovih visokospecijalizovanih interakcija sa antitelima, hormonima (Lander, 1996).

Efekti izlaganja električnim i magnetnim poljima na slobodnoradikalske vrste su ispitani poslednjih godina i postoje 3 glavne podele u ovoj oblasti istraživanja (i) biofizički mehanizmi kojim bi magnetna polja mogla uticati na koncentraciju slobodnih radikala, (ii) biološki i biohemijski mehanizmi povećanog stvaranja radikala u izloženim ćelijama i/ili njihova povećana mogućnost interakcije sa DNK i (iii) potencijalno pojačanje efekta jedinjenja za koja se zna da povećavaju koncentraciju slobodnih radikala. Ovi procesi su odvojeni, ali ne isključuju jedan drugog. Simko i sar. (2001) su objavili da EMP (50 Hz, 0,5-1,5 mT, 45 min) stimuliše fagocitozu i produkciju slobodnih radikala u makrofagima iz mišije koštane srži. Usled izlaganja zapažena je povećana produkcija  $O_2^-$  i fagocitno preuzimanje lateks traka. Povećana produkcija ROS je kasnije pokazana i u drugim istraživanjima (Rollwitz i sar., 2004) u promonocitima i makrofagima iz koštane srži miša, nakon izlaganja EMP (50 Hz, 1 mT). Simko i Mattsson (2004) su ukazali da EMP može delovati kao stimulus koji indukuje aktivirano stanje ćelija kao što su fagocitoza, što dalje pojačava oslobađanje slobodnih radikala dovodeći do mogućih genotoksičnih efekata. Izlaganje može dovesti do (i) direktne aktivacije fagocitoze (ili drugih specifičnih odgovora ćelije) i na taj način produkcije slobodnih radikala, (ii) direktne stimulacije produkcije slobodnih radikala od strane određenih ćelija i (iii) povećanja polživota slobodnog radikala što dovodi do njihove povećane koncentracije. Istraživanja u našoj laboratoriji su pokazala da izlaganje ENF magnetnom polju (50 Hz, 0,5 mT, 7 dana) dovodi do povećane produkcije NO u frontalnoj kori velikog mozga, striatumu, hipokampusu i moždanom stablu pacova. Značajno je povećana i lipidna peroksidacija samo u prednjem mozgu i frontalnoj kori velikog mozga (Jelenković i sar., 2006). Takođe, izlaganje ovom polju smanjuje sadržaj redukovano glutationa u frontalnoj kori velikog mozga i cerebelumu (Jelenković i sar., 2005).

U početnim studijama sa primenjenim EMP, praćene su promene na nivou nervnog sistema i jonskih struja (Adey, 1981; Bawin i Adey, 1976), kao i ponašanja pojedinih sisarskih vrsta (Gavalas i sar., 1970; Kalmijin, 1974). Inicijalne studije izučavanja jonskih mehanizama su bile praćene modifikacijama u razvoju i promenama u ponašanju nakon izlaganja animalnih embriona (Delgado i sar., 1982; Juutilainen i sar., 1986). Istraživanja na nervnom tkivu su dalje dovela do ispitivanja mogućih sličnih fenomena u neneuronalnom tkivu i zaključka da je osetljivost na slaba ENF magnetna polja generalna karakteristika ćelija u tkivima (Adey, 1992). Unutarćelijski enzimi koji su medijatori metaboličkih, signalnih i funkcija rasta su korišćeni kao molekularni markeri prenosnog vezivanja efekata EMP na receptore na površini ćelija. Studije su rađene sa adenilat ciklazama, guanilat ciklazama, protein kinazama i ornitin dekarboksilazom (Luben i sar., 1982; Bawin i sar., 1994; Byus i sar., 1987; Litovitz i sar., 1993).

Brojne studije na eksperimentalnim životinjama su vršene u cilju istraživanja da li ENF magnetno i električno polje mogu uticati na električnu aktivnost mozga, a što je demonstrirano korišćenjem EEG ili izazvanih potencijala nakon predstavljanja senzornih stimulusa (Blackwell, 1986; Dowman i sar., 1989; NIEHS, 1998).

Izučavanja efekata ENF magnetnih polja na neuroendokrini sistem su uglavnom fokusirana na pinealnu žlezdu gde se vrši sinteza i sekrecija hormona melatonina, što je direktno povezano sa cirkadijalnim ritmom (Cagnacci i sar., 1992). Takođe, ispitivan je uticaj EMP na metabolizam serotonina koji je prekursor u sintezi melatonina i pokazano je da kod eksperimentalnih životinja izloženih slabim intermitentnim EMP dolazi do povećanja nivoa serotonina (Lerchi i sar., 1990).

Brojne studije su ispitivale potencijal niskofrekventnih EMP da utiču na nivo drugih neurotransmitera u okviru određenih moždanih struktura. Rana

istraživanja (Vasquez i sar., 1988; Zecca i sar., 1991) su ukazala na efekat akutnog i hroničnog izlaganja jakim električnim poljima na kateholamine i nivo aminokiselinskih neurotransmitera u određenim regionima mozga. Istraživanja Margonato i sar. (1995) su pokazala da hronično izlaganje EMP (50 Hz, 5  $\mu$ T) nema efekta na nivo noradrenalina, dopamina i njihovih glavnih metabolita u striatumu, hipotalamusu, hipokampusu i cerebelumu. Ipak, u sličnoj studiji Zecca i sar. (1998) su uočili efekte na nivo noradrenalina u pinealnoj žlezdi, ali nakon hroničnog izlaganja kombinovanom električnom i magnetnom polju (1 kV/m, 5  $\mu$ T ili 5 kV/m, 100  $\mu$ T). Takođe, EMP ovih karakteristika dovodi do promena i u sistemu opioidnih receptora u frontalnoj kori velikog mozga, parijetalnom korteksu i hipokampusu. U seriji sličnih eksperimenata, različiti autori (Jeong i sar., 2006; Bao i sar., 2006) su uočili da različiti tipovi niskofrekventnih EMP mogu uticati na endogeni opioidni sistem i modulirati odgovor životinja na analgetike i na injektovane opiate kao što je morfin (Kavaliers i sar, 1984; Kavaliers i Ossenkopp, 1987; Kavaliers i Ossenkopp, 1991). Ovi odgovori su kompleksni i magnetno polje ima različite efekte na funkciju raznih podtipova opioidnih receptora. Postoje potvrde da ovi efekti mogu biti povezani sa promenama u funkciji jonskih  $Ca^{2+}$  kanala kod miševa (Kavaliers i sar, 1998) i aktivnosti protein kinaze C, oslobađanja NO i aktivnosti NOS kod puževa *Cepaea nemoralis* (Kavaliers i sar, 1991, 1998). U drugoj seriji eksperimenata, pokazano je da akutno izlaganje pacova EMP (60 Hz, 0,75 mT) smanjuje aktivnost holinergičkih puteva u frontalnoj kori velikog mozga i hipokampusu (Lai i sar, 1993).

Nekoliko studija u kojima se koristio vodeni i radijalni lavirint bavilo se ispitivanjem efekata EMP na prostorno učenje i pamćenje. Ove studije su pokazale da izlaganje pacova i miševa EMP (60 Hz, 100  $\mu$ T) može modulirati uspešnost obavljanja zadatka (Kavaliers i sar., 1993, 1996; Lai, 1996; Lai i sar, 1998; Sienkiewicz i sar., 1998). Izlaganje kompleksnom pulsirajućem

magnetnom polju može takođe uticati na izvršenje postavljenih zadataka (Thomas i Persinger, 1997; McKay i Persinger, 2000). Pored učenja i pamćenja, ENF magnetna polja utiču i na motorno ponašanje eksperimentalnih životinja, pri čemu efekat u velikoj meri zavisi od karakteristika organizma (starost, pol, fiziološko stanje) i primenjenog polja (frekvencija, magnetna indukcija, dužina izlaganja) (Prolić i sar., 2005; Janać i sar., 2012; Rauš i sar., 2012).

Pošto se zna da hormoni imaju odlučujuću ulogu u kontroli seksualnog i drugih oblika ponašanja, rađeno je dosta istraživanja sa izlaganjem eksperimentalnih životinja EMP u poslednjim nedeljama gestacije i prvim postnatalnim danima. Ustanovljeno je da pacovi prenatalno izloženi EMP nemaju dovoljno razvijene maskuline osobine i karakteristično seksualno ponašanje (Ubeda i sar., 1983). U drugoj studiji, trudne ženke pacova su bile izložene pulsirajućem magnetnom polju (15 Hz, 0,3 ms, pik inteziteta 0,8 mT) po 15 min dva puta dnevno od 15.-20. dana gestacije (McGivern i sar, 1990). Pokazano je da nema razlike u broju, veličini i težini okota. Međutim, mužjaci iz okota koji je bio izložen EMP su pokazali znatno smanjeno seksualno ponašanje od kontrolnih.

### **1.2.3. Primena u medicini**

EMP su našla veliku primenu u dijagnostici (MRI - Magnetic Resonance Imaging) u poslednje dve decenije. Predpostavilo se da usled svoje neinvazivne prirode EMP posebno niskofrekventno može imati primenu i u terapiji pošto ima malu energiju i ne dovodi do zagrevanja tkiva (netermalni efekat).

Potencijalna terapijska svojstva repetitivne transkranijalne magnetne stimulacije (rTMS) su našla primenu u psihijatrijskim poremećajima kao što su depresija, manija, opsesivno-kompulsivni poremećaj, postraumatski poremećaji i šizofrenija (Post i Keck, 2001). Indukovanjem električne struje u moždanom

tkivu putem vremenski varirajućeg jakog magnetnog polja, rTMS ima potencijal da direktno ili kroz sinapsu modifikuje nervne puteve koji su izmenjeni u ovim poremećajima. Nedavna istraživanja su pokazala da i visoko- i niskofrekventna rTMS ima antidepresivni efekat kod pacijenata sa velikom depresijom (Hoflich i sar., 1993; Grisaru i sar., 1994; George i sar., 1997). Depresija može biti i povezana sa Parkinsonovom bolešću (PB). Dragašević i sar. (2002) su tretmanom rTMS (0,5 Hz, trajanje pulsa 0,1 msec, 10 dana) pacijenata obolelih od PB pokazali smanjenje depresije koje je trajalo i do 20 dana nakon završenog tretmana, kao i poboljšanje motornih funkcija, bez pojave neželjenih efekata.

Takođe, EMP se pokazao i kao terapijsko sredstvo za tretman i prevenciju osteoporoze na modelu pacova (Akpolat i sar., 2009), kao i faktor koji utiče na gustinu, jačinu, kalcijum i metabolizam u butnoj kosti pacova (Zhang i sar., 2006). Pulsirajuće EMP dovodi i do boljeg i bržeg zarastanja kostiju (Andrew i Bassett, 1993) povećavajući mineralizaciju, angiogenezu i endohondralno okoštavanje.

Bazirano na rezultatima koji pokazuju efekat EMP na opioidne receptore u CNS (Prato i sar., 1995), kao i analgetski efekat kod eksperimentalnih životinja (Thomas i sar., 1997; Shupak i sar., 2004) nedavno su započeta i ispitivanja moguće primene ovog faktora u lečenju hroničnih bolova kao što je slučaj sa reumatoidnim artritismom. Rezultati nisu koherentni zbog različitih karakteristika primenjenih polja. Takođe, EMP olakšava inflamatorni bol uzrokovan psorijazom i tendonitisom (Nindl i sar., 2000; Thomas i sar., 2001; Johnson i sar., 2004). Neki od poslednjih radova ukazuju na primenu statičkog magnetnog polja u tretmanu "post-polio" bola, hroničnog poremećaja sa bolom u zglobovima i hiperalgezijom, gde je primenjeno polje dovelo do smanjenja bola (Vallbona, 1997). Primenjujući EMP, Rollman i sar. (2002) su u pilot studiji potvrdili analgetsko dejstvo EMP.

Postoje i eksperimentalni podaci (Robertson i sar., 2007) na osnovu kojih bi se u budućnosti moglo primeniti EMP u terapiji srčanog i moždanog udara. Tako recimo, primenjeno pulsirajuće EMP smanjuje veličinu infarkta delujući na protok krvi i angiogenezu pacijenata (Andrew i Bassett, 1993).

## **2. CILJEVI RADA**

Moždani udar, kao posledica moždane ishemije, predstavlja jednu od vodećih bolesti današnjice za koju ne postoji efikasna terapija. U svetlu poznatih činjenica o dejstvu niskofrekventnih EMP na morfo-funkcionalne karakteristike CNS, možemo pretpostaviti da ovo polje utiče i na razvoj patofizioloških događaja i oporavak u uslovima moždane ishemije.

Na osnovu svega iznetog postavljeni su sledeći ciljevi ovog eksperimentalnog rada:

- Ispitati da li EMP (0,5 mT, 50 Hz, 7 dana) utiče na hipermotorno ponašanje pustinjačkih miševa izazvano globalnom moždanom ishemijom i to 1., 2., 4. i 7. dana (neposredan efekat EMP), kao i 14. dana nakon reperfuzije (odloženi efekat EMP).
- Ispitati da li primenjeno EMP utiče na morfološke promene u najosetljivijim strukturama mozga (hipokampus, striatum i kora velikog mozga) koje su izazvane ishemijom 7. i 14. dana nakon reperfuzije, na osnovu histološke analize i stereološke kvantifikacije neurona i glija ćelija
- Ispitati da li primenjeno EMP utiče na parametre oksidativnog stresa u pojedinim regionima mozga ishemičnih pustinjačkih miševa 7. i 14. dana nakon reperfuzije.

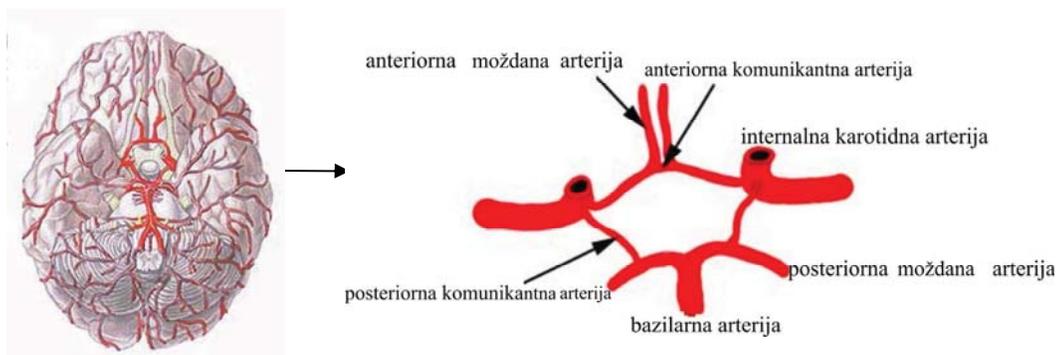
### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentima su korišćeni mužjaci pustinjskog miša (*Meriones unguiculatus*) starosti 3 meseca i telesne težine 55-60 g (slika 12.), odgajani u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja, VMA, Srbija. Ove životinje predstavljaju dobar model za izazivanje eksperimentalne moždane ishemije, jer imaju nepotpun Vilisov krug (*Circulus Willisii*, slika 13.) koji omogućava kolateralni krvotok između sliva karotidnih arterija i sliva vertebrobazilarne arterije. Upravo zbog tih anatomskih karakteristika, bilateralna okluzija karotidnih arterija dovodi do globalne ishemije prednjeg mozga i predstavlja relativno jednostavnu i pouzdanu tehniku izazivanja moždanog udara u ovom animalnom modelu.



Slika 12. Pustinjski miš (*Meriones unguiculatus*)



Slika 13. Vilisov krug

Grupe od po 4 životinje po kavezu (Ehret GmbH & Co. KG, Nemačka) su se nalazile u klimatizovanoj prostoriji i pri standardnim uslovima (temperatura sobe  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , relativna vlažnost vazduha  $55\pm 10\%$ , svetlo uključeno 12 h u toku dana od 07:00-19:00). Hrana i voda su davani *ad libitum*. Prema eksperimentalnim životinjama se postupalo u skladu sa „Vodičem za brigu i korišćenje laboratorijskih životinja (NIH publikacija No 85-23, 1985). Na osnovu rešenja etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ životinje su bile izložene eksperimentalnom protokolu koji je u skladu sa propisanim etičkim normama.

### 3.2. Eksperimentalni model globalne moždane ishemije

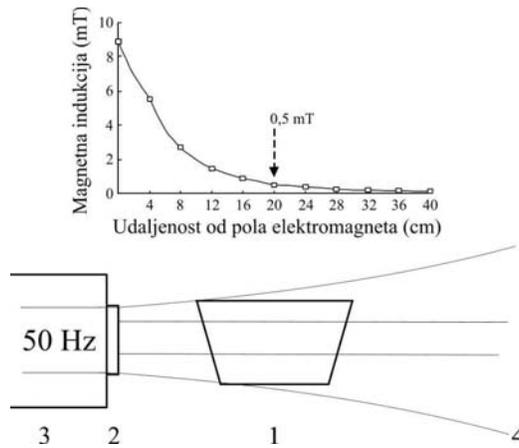
Životinje su anestezirane dietil etrom (Carlo Erba Reagenti, Italija) i stavljene u dorzalni položaj. Područje vrata na ventralnoj strani je obrijano. Pristup karotidnim arterijama omogućen je sagitalnom incizijom i preparacijom perivaskularnog tkiva na ventralnoj strani vrata eksperimentalne životinje. Na obe karotidne arterije su stavljene mikroaneurizmalne klipse po *Heitzu*, prvo na levu pa na desnu arteriju u trajanju od 10 minuta. Trajanje ishemije je mereno od momenta stavljanja do momenta skidanja desne aneurizmalne klipse. Nakon što su uklonjene, reperfuzija je potvrđena i vizuelno, a koža je ušivena sa 3-4 šava. Kod *sham* operisanih životinja urađena je incizija na vratu bez okluzije karotidnih arterija. Pustinjskim miševima je bilo dozvoljeno da se oporave u kavezima 2 h uz prisustvo Xenon grejne lampe, a potom su vraćeni u odeljenje sa životinjama.

### **3.3. Elektromagnetno polje**

Kao izvor EMP je korišćen elektromagnet sa jezgrom od metalnih transformatorskih pločica i dijametrom od 9,5 cm. Elektromagnet je napajan sinusoidalnom strujom (50 Hz, 40 V, 4,5 A) i stvarao je relativno homogeno EMP sa gradijentom magnetne indukcije (slika 14.). Kod EMP ovakvih karakteristika moguće je razdvojiti električnu i magnetnu komponentu pošto je na frekvencijama do 10 kHz, električna komponenta zanemarljiva pa sve eventualne efekte na nas model možemo pripisati magnetnoj komponenti. Maksimalna vrednost magnetne indukcije je bila 8,9 mT, izmerena na polovima elektromagneta uz pomoć GM05 gausmetra sa PT2837 sondom (Hirst, V. Britanija). Frekvencija od 50 Hz je izabrana zato što je u Evropi u upotrebi električno napajanje kućnih i drugih aparata ovom frekvencijom. Linije magnetnih sila su bile paralelne horizontalnoj komponenti lokalnog geomagnetnog polja. Tokom eksperimenta, geomagnetska aktivnost u području gde su vršena merenja (44°38' severno, 20°46' istočno) su bile u okviru prosečnih (mereno GSM-19 v6.0 proton magnetometrom – GEM SYSTEMS INC, Ontario, Canada, Republički geodetski zavod, Odsek za geodetske radove, Odeljenje za geomagnetizam i aeronomiju, Grocka, Beograd, Srbija). Elektromagnet je bio smešten u izolovanu sobu u kojoj su bili isti uslovi kao i u vivarijumu (temperatura, vlažnost vazduha, osvetljenje).

Tokom izlaganja EMP, pustinjски miševi su se nalazili u standardnim kavezima (26 cm x 43 cm x 15 cm). Istovremeno su stavljana dva kaveza, po jedan sa leve i desne strane elektromagneta. Kavezi su bili na dovoljnoj udaljenosti kako bi se izbegle eventualne vibracije i zagrevanje. Centar svakog kaveza se nalazio na udaljenosti od 20 cm od elektromagnetnog pola. Središnji deo kaveza je bio izložen EMP prosečne magnetne indukcije  $B=0,5$  mT. Opseg u kome se kretala vrednost magnetne indukcije unutar kaveza je bila 2 – 0,2 mT, s

obzirom na rastojanje od elektromagnetnog pola. Nakon izlaganja EMP životinje su vraćene u vivarijum.



**Slika 14.** Sistem za izlaganje EMP. (1) kavezi sa pustinjским miševima, (2) magnetni pol od gvozdеног magnetnog jezgra, (3) namotaji i (4) linije sile magnetnog polja

### 3.4. Motorno ponašanje

Motorno ponašanje pustinjских miševa je praćeno u testu otvorenog polja („open field“). Svaka životinja je stavljana odvojeno u kaveze od pleksiglasa (41 cm x 41 cm x 41 cm) i ponašanje četiri životinje je istovremeno snimano Logitech digitalnom kamerom pozicioniranom iznad kaveza. Različiti parametri ponašanja kao što su lokomocija (pređeni put (m), tj. rastojanje koje je životinja prešla i prosečna brzina kretanja (m/s) životinje u toku testiranja), stereotipija (pokreti glavom (m) koje životinja napravi u toku testiranja), rotacije (broj rotacija za 360° koje napravi životinja u smeru ili suprotno od smera kretanja kazaljke na satu u toku testiranja) i mirovanje (vreme (s) u toku kojeg je životinja mirovala u toku testiranja, pri čemu je životinja morala da bude nepokretna najmanje 10 s da bi se to smatralo kao mirovanje) su automatski

analizirani korišćenjem Any-maze softvera (Stoelting Co., Wood Dale, Illinois, SAD).

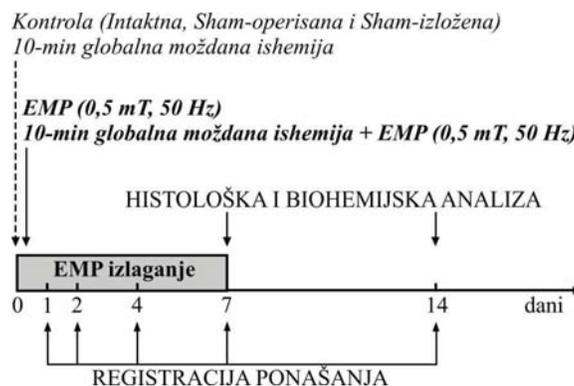
Kavezi su bili smešteni u zasebnu, svetlosno i zvučno izolovanu prostoriju sa veštački regulisanom ventilacijom, svetlošću i temperaturom ne bi li se uklonila mogućnost bilo kakve interakcije pustinjačkih miševa sa spoljašnjom sredinom tokom trajanja eksperimenta. Pod svakog kaveza je opran vodom i osušen pre stavljanja nove životinje.

### 3.5. Eksperimentalna procedura

Pustinjački miševi su bili podeljeni u sledeće grupe: Intaktna, Sham-operisana, Sham-izložena, EMP, Ishemija, Ishemija+EMP.

Intaktni pustinjački miševi nisu bili podvrgnuti bilo kom tipu operacije i/ili izlaganja/tretmana. EMP grupa je bila kontinuirano izložena magnetnom polju (0,5 mT, 50 Hz) u toku 7 dana. Sham-izložene životinje su bile podvrgnute istom protokolu kao EMP izložene sa isključenim elektromagnetom.

Ishemični pustinjački miševi su bili podvrgnuti 10-min okluziji obe karotidne arterije bez (Ishemija) ili sa (Ishemija+EMP) izlaganjem magnetnom polju. Neposredno nakon okluzije, ishemične životinje su izložene EMP (0,5 mT, 50 Hz) u toku 7 dana. Sham-operisani pustinjački miševi su bili podvrgnuti istoj operacionoj proceduri kao ishemični samo bez okluzije obe karotidne arterije.



Slika 15. Eksperimentalna procedura.

Motorno ponašanje eksperimentalnih životinja registrovano je u identičnim uslovima i to u periodu od 09:00-15:00 da bi se izbegao efekat drugačije motorne aktivnosti u popodnevnim časovima. Ponašanje pustinjačkih miševa registrovano je 1., 2., 4. i 7. dana nakon reperfuzije (neposredni efekat EMP), kao i 14. dana nakon reperfuzije (odloženi efekat EMP) tokom 60 min, uvek u isto doba dana. Pre ishemije ili izlaganja EMP, pustinjački miševi nisu bili izloženi testu otvorenog polja („open field“) da bi promene u ponašanju došle do punog izražaja usled izlaganja životinja novoj sredini na koju se nisu habituiraile.

Histološka i biohemijska analiza (kora velikog mozga, hipokampus i striatum) promena u mozgu urađena je kod životinja žrtvovanih 7. i 14. dana od početka eksperimentalne procedure.

### **3.6. Histološka analiza**

Nakon dekapitacije, izolovani mozgovi su, za sečenje na kriokatu, fiksirani 24 h u 4 % paraformaldehidu (Merck, Nemačka). Nakon toga su dehidratirani u rastućim koncentracijama saharoze (10 %, 20 % i 30 %, BDH Prolabo, Belgija). Mозgovi su zamrznuti u 2-metil butanu (Acros Organics, USA) i čuvani na -70° C. Koronalni 25 μm tanki preseći su pripremljeni na kriokatu (Leica, Nemačka) i stavljeni na želatinizirane pločice (Menzel GmbH, Nemačka).

U slučaju pripreme za sečenje na mikrotomu (Leica, Nemačka), izolovani mozgovi su fiksirani u buenu (Merck, Nemačka) 48 h i potom sprovedeni kroz rastuću koncentraciju alkohola (30 %, 50 %, 70 %, 96 %, 100 %) u trajanju od po 1 h. Nakon toga mozgovi su sprovedeni kroz ksilol (2 x 15 min) i kalupljeni tj potapani u rastopljen parafin čime su dobijani parafinski blokovi spremni za dalju obradu tj. sečenje. Parafinski preseći su bili debljine 5 μm.

### *Hematoksin/eozin bojenje*

Hematoksin/eozin spada u rutinsko histološko bojenje kojim dobijamo grubi uvid u morfologiju ispitivane strukture (hematoksinom su plavo obeležena jedra a eozinom crveno citoplazma ćelija).

Nakon deparafinizacije koja je sprovedena u ksilolu 2 x 5 min usledila je serija alkohola opadajućeg gradijenta (100 %, 96 %, 70 % u svakom po 5 min) kao korak rehidratacije. Nakon 5 min ispiranja u destilovanoj vodi pločice su stavljene u hematoksin 5 min, a potom isprane u vodi. Nakon toga pločice sa presecima su prebačene u eozin 5 min, isprane u alkoholu, pa provučene kroz seriju alkohola rastućeg gradijenta po 5 min u svakom. Potom su pločice bile 2 x 5 min u ksilolu nakon čega su prekrivene pokrovnim stakalcima primenom kanada balzama (Fisher Scientific, Velika Britanija).

### *Krezil violet bojenje*

Krezil violet bojenjem se obeležavaju neuroni. Preseci sečeni na kriokatu se sprovode kroz opadajuću koncentraciju alkohola (100 %, 96 %, 70 % u svakom po 5 min). Nakon 5 min ispiranja u destilovanoj vodi pločice su stavljene u rastvor krezil violeta (MP Biochemicals, SAD) 5 min. Nakon toga pločice sa presecima su provučene kroz seriju alkohola rastućeg gradijenta (70 %, 96 %, 100 % po 5 min u svakom). Potom su pločice bile 2 x 5 min u ksilolu nakon čega su prekrivene pokrovnim stakalcima primenom kanada balzama.

### *NeuroTrace/Dil/DAPI bojenje*

Trostruko fluorescentno obeležavanje neurona, membrana i jedara na koronarnim presecima je urađeno primenom NeuroTrace, Dil i DAPI bojenja (Invitrogen/Molecular probes, USA). Pločice sa presecima su hidratisane u 0,1

M PBS (fosfatni pufer, pH=7,4, Merck, Nemačka) (3 puta po 10 min). NeuroTrace (razblaženja 1/300 u 0,01 M PBS) je aplikovan u trajanju od 20 min i nakon toga ispran u 0,01 M PBS (3 puta po 10 min). Onda je aplikovan DAPI (razblaženja 1/2000 u 0,01 M PBS) u trajanju od 10 min, ispran u 0,01 M PBS (5 puta po 5 min) nakon čega je aplikovan Dil (razblaženja 1/500 u 100 % alkoholu), u trajanju od 10 min, ispran u 0,01 M PBS. Posle ovog bojenja na pločice je nakapan Mowiol (Sigma-Aldrich, USA) i stavljena su pokrovna stakla.

### *Fluoro-Jade bojenje*

Fluoro-Jade (FJ) fluorescentni marker se, između ostalog, uspešno koristi za obeležavanje smrti neurona nakon globalne moždane ishemije (Larsson i sar., 2001). Pločice sa preseccima su prvo bile potopljene u rastvor 1 % NaOH (Carlo Erba Reagenti, Italija) u 80 % alkoholu (Alkaloid Skopje, Makedonija) 5 min, nakon čega su 2 min bile u 70 % alkoholu i 2 min u destilovanoj vodi. Pločice su nakon toga prebačene u rastvor 0,06 % kalijum permanganata 15 min i isprane u destilovanoj vodi 2 min. Nakon toga, prebačene su u 0,04 % FJ (Millipore, USA) rastvorenog u 0,1 % sirćetnoj kiselini (Merck, Nemačka), 20 min. Nakon tri ispiranja u destilovanoj vodi (po 1 min) pločice su inkubirane sa DAPI (razblaženje 1/2000 u 0,01 M PBS, Invitrogen/Molecular probes, USA) 10 min, isprane u 0,01 M PBS, dehidratisane i potopljene u ksilol (Merck, Nemačka) 10 min i pokrivene pokrovnim staklima.

### *Imunohistohemijska bojenja*

Imunohistohemijsko bojenje astrocita je urađeno primenom monoklalnog antitela miša na GFAP (Abcam, USA), a mikroglije poliklalnog antitela koze na Iba1 (jonizovani kalcijum vezujući adaptorni

molekul 1, Abcam, USA). Preseci su pretretirani 0,1 M PBS (3 puta po 10 min), 0,1 % glicinom (10 min, ICN Biomedicals, USA), 3 % goveđim serum albuminom (BSA, 20 min, MP Biomedicals, USA), blokirajućim serumom (5 % majmunski serum, Santa Cruz, USA), 3 % BSA, 0,2 % Triton X (Sigma-Aldrich, USA) u trajanju od jednog sata. Primarna antitela (razblaženja 1/300 za GFAP i 1/700 za Iba1) su aplikovana i inkubirana preko noći na +4° C (antitela su razblažena u 0,01 M PBS koji je sadržavao 1 % BSA, 2 % Triton X i 1 % magarećeg seruma). Nakon nekoliko ispiranja u 0,01 M PBS, preseci su inkubirani 2 h na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelom - Alexa Fluor 555 magareće anti-mišje za GFAP (razblaženja 1/250, Invitrogen/Molecular probes, USA) i Alexa Fluor 488 magareće anti-kozije za Iba1 (razblaženja 1/250, Invitrogen/Molecular probes, USA). Nakon toga, preseci su isprani u 0,01 M PBS i inkubirani sa DAPI (razblaženja 1/2000, Invitrogen/Molecular probes, USA) 10 min. Nakon 5 ispiranja, na preseke je nakapan Mowiol i stavljeno pokrovno staklo.

Fluorescentno obeleženi preseci su analizirani i fotografisani na Zeiss Axiovert fluorescentnom mikroskopu (Nemačka), opremljenom kamerom i EC Plan-Apochromat na uveličanju 20x u slučaju FJ i GFAP bojenja i uveličanju 40x kada je mikroglija bila u pitanju.

### **Stereološka analiza**

Stereologija (od grčkih reči *stereos* - solidan, trodimenzionalan i *logos* - nauka) je naučna grana definisana kao multidisciplinarna metodologija kojom se iz dvodimenzionalnih preseka tela kvantitativno procenjuje njihova trodimenzionalna unutrašnja građa (Howard i Reed, 2005).

Stereološka analiza je rađena uz pomoć newCAST stereološkog softverskog paketa (VIS - Visiopharm Integrator System, version 2.12.1.0;

Visiopharm; Danska). Mikroskop (Olympus BX-51) je opremljen sa motorizovanim stočićem (Prior) sa preciznošću pomeranja po x-y osi od 1  $\mu\text{m}$ . Pomeranje stočića po z osi kontrolisano je mikrokatorom (Heidenhain MT1201) sa preciznošću od 0,2  $\mu\text{m}$ . Za mikroskop je vezana CCD video kamera (PixeLink). Pri analizi korišćeni su planahromatski objektivni visoke numeričke aperture, uvećanja 4x, 20x i 100x. NewCast stereološki sistem je generisao interaktivnu stereološku mrežicu i stereološki disektorski ram.

Kako bi bila određena tačna debljina preseka (22,6  $\mu\text{m}$ ), neophodna u stereološkoj analizi, korišćena je block advance (BA) metoda (Dorph-Petersen i sar., 2001). Ova metoda se sastoji u sledećem: preseki bloka tkiva se seku, sa sečenjem se visina bloka smanjuje, a smanjenje je označeno kao blok unapred (doslovno prevedeno) tj. block advance, jer definiše rastojanje za koje je parafinski blok napredovao prema nožu mikrotoma pre sečenja preseka. BA predstavlja debljinu preseka bez deformacija. Kako bi utvrdili prosečnu BA treba iseći veliki broj preseka bloka i izmeriti promene u visini bloka. Izmerena promena se deli sa brojem preseka. Koristeći metod BA ustanovljeno je da je stvarna debljina preseka 22,6  $\mu\text{m}$ .

#### *Određivanje volumena hipokampusa i striatuma*

Volumen hipokampusa je određen primenom Kavalijerijevog principa (Gundersen, 1986; Gundersen i Jensen, 1987). Izvršena je analiza hipokampusa posteriorno od bregme (od 1,7 mm do 2,5 mm), kao i striatuma (od 1,7 mm pre bregme pa do 0,82 mm posteriorno od bregme) (bazirano na anatomskom atlasu mišijeg mozga Paxinos i Franklin, 2004). Uzorkovanje serijskih koronalnih preseka hipokampusa i striatuma debljine 25  $\mu\text{m}$  i obojenih krezil violetom je bilo sistematski uniformno sa slučajnim početkom. Nakon procesa dehidratacije i završenog bojenja izmerena je realna debljina preseka koja je

iznosila 22,6  $\mu\text{m}$ . Svaki 14. presek hipokampusa, tj. 32. presek striatuma iz svakog bloka tkiva je uziman što je približno 24 preseka hipokampusa tj. 27 preseka striatuma po životinji. Broj pogodaka *komputerski generisane mrežice* koji se nalaze u okviru granica tkiva je utvrđen i površina je preračunata. Volumen ( $\text{mm}^3$ ) leve i desne hemisfere je određen umnožavajući sumu površina sa intervalom između preseka (345  $\mu\text{m}$  u hipokampusu i 920  $\mu\text{m}$  u striatumu) na osnovu formule:

$$\bar{V} = a(p) \cdot BA \cdot \sum_{i=1}^n P_i$$

gde je  $a(p)$  površina koja pripada svakoj tački uzorkovanja tj. jednom pogotku koji pada na analiziranu fazu (52 219,50  $\mu\text{m}^2$ ), BA srednja vrednost između dva uzastopno analizirana preseka i  $\sum P_i$  suma pogodaka koji padaju na fazu ispitivane strukture. Rezultati su modifikovani realno izmerenom debljinom preseka tj. 22,6  $\mu\text{m}$ .

#### Volumenska gustina FJ pozitivnih neurona i GFAP obeleženih astrocita

Koristeći fotomikrografije fluorescentno obeleženih preseka iz 4-5 nivoa hipokampusa za svaku životinju, izračunat je procenat FJ pozitivnih neurona i GFAP obeleženih astrocita. Vodilo se računa da odgovarajući preseci iz svih analiziranih životinja budu iz istog koronarnog nivoa. Fotomikrografije su importovane u Vis program, dok je površina u kojoj je vršeno brojanje određena uz pomoć maske. Brojani su pogotci koji padaju na FJ pozitivne neurone ili GFAP obeležene astrocite i potom je ovaj broj podeljen sa *ukupnim* brojem pogodaka koji padaju u oblast hipokampusa  $\times 100$ , i na taj način je izračunat procenat fluorescentno obeleženih FJ neurona i imunoobeleženih astrocita.

*Broj Iba1 obeleženih mikroglijalnih ćelija po jedinici površine*

Koristeći fotomikrografije fluorescentno obeleženih preseka iz 4-5 nivoa hipokampusa za svaku životinju, izračunat je broj mikroglijalnih ćelija. Vodio se računa da odgovarajući preseki iz svih analiziranih životinja budu iz istog koronarnog nivoa. Za kvantitativnu analizu sve Iba1 obeležene mikroglijalne ćelije, sa DAPI obeleženim jedrima, su bile brojane sa mikrografija čija je veličina bila 280 x 210 µm, zatim je vršeno preračunavanje na jediničnu površinu (mm<sup>2</sup>) i ovaj rezultat je predstavljen kao broj mikroglijalnih ćelija po mm<sup>2</sup>.

### **3.7. Biohemijska analiza**

Posle dekapitacije, glave životinja su smrjavane u tečnom azotu i čuvane na -70° C. Tokom izolovanja određenih regiona mozga, glave su odmrjavane i sve manuelne operacije su izvođene na ledu. Mozak je brzo vađen i izolovane su sledeće strukture: kora prednjeg mozga, hipokampus, striatum. Izolovane strukture svake životinje posebno su homogenizovane u hladnom saharoznom medijumu (0,25 mol/l saharoze i 1 mmol/l Na<sup>+</sup>-etilendiamin tetrasirćetna kiselina (EDTA) u 10 mmol/l K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-fosfatnom puferu pH=7,4), u staklenom homogenizatoru sa teflonskim tučkom sa 15 udara tučka pri 800 obrtaja/min. Homogenat je centrifugiran na 3500 obrtaja/min tokom 15 min; supernatant je odvajan i sonifikovan 3 x 30 s sa pauzama od 5 s. Nakon sonifikacije supernatant (neprečišćena mitohondrijalna frakcija) je čuvan na -70° C.

### 3.7.1. Određivanje proteina

Sadržaj proteina u uzorcima je određivan po metodi Lowry-a (Lowry i sar., 1951). Ukupna koncentracija proteina je srazmerna boji rastvora uzorka, proporcionalna koncentraciji proteina i može se meriti kolorimetrijski. U 10  $\mu$ l uzorka, standarda i blankova je dodavano po 1 ml reakcione smeše (0,5 %  $\text{CuSO}_4$  i Folin-ov reagens). Nakon inkubacije od 30 min na sobnoj temperaturi ekstinkcija je spektrofotometrijski određivana na talasnoj dužini od 575 nm. Standardna kriva je konstruisana na osnovu poznatih rastućih koncentracija BSA. Vrednosti su izražavane kao miligrami proteina po mililitru uzorka (mg prot./ml).

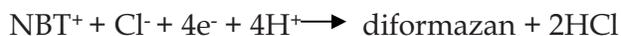
### 3.7.2. Određivanje koncentracije superoksidnog anjon radikala - $\text{O}_2^-$

Kao mera stvaranja  $\text{O}_2^-$  u biološkim i hemijskim sistemima, koristi se test redukcije nitroblu-tetrazolijuma (NBT) do nitrobluformazana (Spitz i Oberley, 1989). Redukcija NBT se odvija u dva koraka:

- a) Kao nepotpuna redukcija do monoformazana



- b) Kao kompletna redukcija NBT-hlorida do diformazana:



U oksidovanoj formi NBT je žuta supstanca rastvorljiva u vodi, dok je njegova redukcija u diformazan praćena promenom u intezivno plavu i smanjenjem rastvorljivosti. U vodenim rastvorima reakcije koje generišu  $\text{O}_2^-$  rezultuju nekompletnom redukcijom NBT do monoformazana. Povećanje redukcije NBT pri višim pH vrednostima rezultat je inhibicije reakcije dizmutacije  $\text{O}_2^-$  katalizovane SOD, koja kompetira sa reakcijom redukcije NBT.

Redukcija NBT se iz istog razloga povećava smanjenjem tenzije kiseonika u medijumu.

Reakcija je otpočinjana dodavanjem 0,05 ml uzorka u 1 ml reakcione smeše (NBT 0,1 M u fosfatnom puferu 6,5 mmol/l, pH 8,6, EDTA 0,1 % želatin 0,1 mg/ml) i promena ekstinkcije je praćena tokom 5 min na 515 nm. Pre merenja, reakciona smeša je u trajanju od 1 h bila izložena N<sub>2</sub> pod pritiskom. Sva merenja su urađena u triplikatu. Rezultati su izraženi kao mikromoli redukovanog NBT po minutu po miligramu protein (μM NBT/min/mg prot.).

### **3.7.3. Određivanje koncentracije azotoksida - NO<sub>•</sub>**

NO<sub>•</sub> se u vodenom rastvoru brzo prevodi u nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) i nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), koji su prvi stabilni metaboliti NO<sub>•</sub>. Stoga je u uzorcima određivana količina NO<sub>2</sub><sup>-</sup> i NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kao pokazatelj produkcije NO<sub>•</sub>. Metoda za određivanje količine NO<sub>2</sub><sup>-</sup> i NO<sub>3</sub><sup>-</sup> u uzorcima zasniva se na Griess reakciji (Guevara i sar., 1998). Uzorci su najpre deproteinizovani dodavanjem 120 μl uzorka u 480 μl Somogyi reagensa (ZnSO<sub>4</sub> (75 mmol/l) + 600 μl NaOH (96,25 mmol/l)). Rastvor je ostavljen 10 min da bi se izvršila efikasna precipitacija proteina, a potom je centrifugiran 10 min na 8000 obrtaja/min.

Kako Griess reakcija ne određuje količinu nitrata, a kako su oni u biološkim tečnostima kvantitativno dominantniji u odnosu na nitrite, ukupna količina nitrita je određena nakon konverzije NO<sub>3</sub><sup>-</sup> u NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pomoću kadmijumskih (Cd) granula aktiviranih bakrom. Nakon pripremljene serije u svaku epruvetu dodato je po 1-1,5 g sveže aktiviranih Cd granula. Aktivacija Cd granula se vrši neposredno pred upotrebu dodavanjem 100 ml 5 mmol/l rastvora CuSO<sub>4</sub> u glicin-NaOH puferu. Nakon 90 min od dodavanja Cd granula iz svake epruvete uzeto je po 100 μl rastvora i preneto u čašice ploče ELISA spektrofotometra i radi izvođenja bojene reakcije svakoj probi je dodato po 100

$\mu$ l rastvora sulfanilne kiseline (Griess I) i rastvora  $\alpha$ -naftilamina (Griess II). Nakon 30 min vrednosti ekstinkcije su očitavane na ELISA spektrofotometru pri talasnoj dužini od 492 nm i referentnoj talasnoj dužini od 650 nm. Napravljena je standardna kriva za seriju razblaženja  $\text{NaNO}_2$ . Dobijena jednačina je upotrebljena za izračunavanje nepoznate koncentracije  $\text{NO}_2^-$  u uzorcima. Sva merenja su urađena u triplikatu. Rezultati su izraženi kao mikromoli po miligramu proteina ( $\mu\text{mol}/\text{mg prot.}$ ).

#### **3.7.4. Određivanje aktivnosti ukupne superoksiddismutaze - SOD**

Ukupna SOD aktivnost uključuje aktivnost dve izoforme SOD (citoplazmatične SOD1 - Cu,ZnSOD i mitohondrijalne SOD2 - MnSOD izoforme) i predstavlja meru aktivnosti ukupnog endogenog antioksidativnog potencijala. Aktivnost ukupne SOD određivana je kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u baznoj sredini, uzorkom neprečišćene mitohondrijalne frakcije (Fridovich, 1995). SOD, uklanjajući  $\text{O}_2^-$ , inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina. Step en inhibicije srazmeran je aktivnosti enzima.

Aktivnost ukupne SOD (EC 1.15.1.1) određivana je kinetički, kao promena ekstinkcije u vremenu (10 min) na 480 nm. Reakcionoj smeši ( $\text{Na}^+$ -bikarbonatni pufer 50 mmol/l, pH=10,2 sa 1 mmol/l EDTA) je dodavano 0,1 ml uzorka i reakcija je otpočinjana dodavanjem 0,1 ml adrenalina (10 mmol/l u 0,01 M HCl). Reakcija je praćena kinetički tokom 10 min na 25° C (Beckman, DU 8 Spektrofotometar).

Kao vrednost u odnosu na koju je računata inhibicija služila je promena ekstinkcije iste reakcione smeše kojoj je umesto uzorka dodavano 0,1 ml vode. Sva merenja su urađena u triplikatu. Rezultati su izraženi kao jedinice aktivnosti enzima po miligramu proteina (U/mg prot.). Jedinica aktivnosti

enzima definisana je kao aktivnost enzima koja dovodi do 50 % inhibicije autooksidacije adrenalina.

### 3.7.5. Određivanje indeksa lipidne peroksidacije - ILP

Malondialdehid (MDA), produkt polinezasićenih masnih kiselina, reaguje sa tiobarbiturnom kiselinom i to je obično pokazatelj ILP. ILP je meren spektrofotometrijski kao tiobarbiturna kiselina reaktivna vrsta. Sadržaj reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline formiranih spontano i *in vitro*, stimulisano 0,01 mM Fe<sup>2+</sup> solima i 0,5 mM askorbinskom kiselinom, meren je nakon tretmana uzoraka sa 1 mL hladnim reagensom tiobarbiturne kiseline (15 % trihlorsirćetna kiselina, 0,1 M HCl, 0,75 % tiobarbiturna kiselina) i kasnijeg zagrevanja na temperaturi od 95° C u prisustvu 50 µM desferoksamina, da bi se sprečila dalja lipidna peroksidacija katalizovana Fe<sup>2+</sup> (Rehncrona i sar., 1980). Apsorbanca je merena na talasnoj dužini od 533 nm. Kontrolne vrednosti (bez stimulacije Fe<sup>2+</sup> i askorbinskom kiselinom) su određene za svaki uzorak. Sva merenja su urađena u triplikatu. Rezultati su izraženi kao nanomol MDA po miligramu proteina (nM MDA/mg prot.).

### 3.8. Statistička analiza

Pre statističke analize provereno je da li podaci imaju normalnu raspodelu uz pomoć Kolmogorov-Smirnov testa.

Efekti EMP na hipermotorno ponašanje izazvano globalnom moždanom ishemijom su određeni primenom dvofaktorijalne analize varijanse, sa tretmanom i vremenom nakon reperfuzije kao faktorima, nakon čega je urađen *post hoc* LSD test.

Efekti EMP na morfološke promene u mozgu izazvane globalnom moždanom ishemijom su procenjeni primenom jednofaktorijalne analize varijanse, praćene *post hoc* LSD testom.

Efekti EMP na parametre oksidativnog stresa u kori prednjeg mozga, striatumu i hipokampusu ishemičnih pustinjčkih miševa su određeni primenom jednofaktorijalne analize varijanse, praćene *post hoc* LSD testom.

Rezultati su razmatrani kao statistički značajni kada je  $p < 0.05$ .

## **4. REZULTATI**

### **4.1. Efekti EMP (0,5 mT, 50 Hz) na motorno ponašanje pustinjskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom**

Početnom statističkom analizom ustanovljeno je da ne postoje razlike u ponašanju intaktnih, sham-operisanih i sham-izloženih pustinjskih miševa u okviru svakog merenja, tj. 1., 2., 4., 7. i 14. dana od početka eksperimentalne procedure (rezultati nisu prikazani). Svi ovi podaci su akumulirani i izraženi kao kontrolna vrednost svakog pojedinačnog merenja. U skladu sa našim prethodnim istraživanjima (Janać i sar., 2005, 2012) izlaganje EMP (0,5 mT, 50 Hz) povećava motornu aktivnost.

Rezultati istraživanja pokazuju da ishemija sama, kao i u kombinaciji sa izlaganjem EMP, ima za posledicu specifičan vremenski profil promena u ponašanju pustinjskih miševa (tabela 2.). Kod ishemičnih životinja, lokomocija (slika 16.), stereotipija (slika 17.) i rotacije (slika 18.) su bili značajno povećani do 4. dana nakon reperfuzije (tabela 3.) i nakon toga su se polako smanjivali dostižući kontrolne vrednosti 7. dana nakon reperfuzije. Ova postishemijska motorna hiperaktivnost je bila praćena značajno smanjenim vremenom mirovanja, naročito 1. i 2. dana nakon reperfuzije, u odnosu na kontrolne životinje (slika 19.).

**Tabela 2.** Dvofaktorijalna analiza varijanse  
df - stepeni slobode;  $\eta_p^2$  - parcijalni eta kvadrat

	df	Pređeni put			Prosečna brzina			Stereotipija			Rotacije u smeru kazaljke na satu			Rotacije suprotno od smera kazaljke na satu			Mirovanje		
		F	p<	$\eta_p^2$	F	p<	$\eta_p^2$	F	p<	$\eta_p^2$	F	p<	$\eta_p^2$	F	p<	$\eta_p^2$	F	p<	$\eta_p^2$
Tretman	3	29,10	0,001	0,4	29,10	0,001	0,4	28,60	0,001	0,4	18,9	0,001	0,3	10,3	0,001	0,2	19,8	0,001	0,3
Vreme nakon reperfuzije	4	16,20	0,001	0,3	16,40	0,001	0,3	14,40	0,001	0,3	9,0	0,001	0,2	10,9	0,001	0,2	7,7	0,001	0,2
Tretman x vreme nakon reperfuzije	12	5,7	0,001	0,3	5,7	0,001	0,3	5,3	0,001	0,3	2,7	0,01	0,2	4,0	0,001	0,2	1,7	0,056	0,1

**Tabela 3.** Značajne razlike u ponašanju pustinjačkih miševa podvrgnutih 10-min globalnoj moždanoj ishemiji bez i sa izlaganjem EMP (0,5 mT, 50 Hz, 7 dana) u poređenju sa kontrolnim životinjama

		Pređeni put	Prosečna brzina	Stereotipija	Rotacije u smeru kazaljke na satu	Rotacije suprotno od smera kazaljke na satu	Mirovanje
Kontrola vs	1. dan	***	***	***	***	***	***
Ishemija	2. dan	***	***	***	***	***	***
	4. dan	*	*	*			
Kontrola vs							
Ishemija+							
EMP	1. dan	*	*	*	*	*	

\* $p < 0,05$  i \*\*\* $p < 0,001$  (dvofaktorijalna analiza varijanse praćena LSD testom)

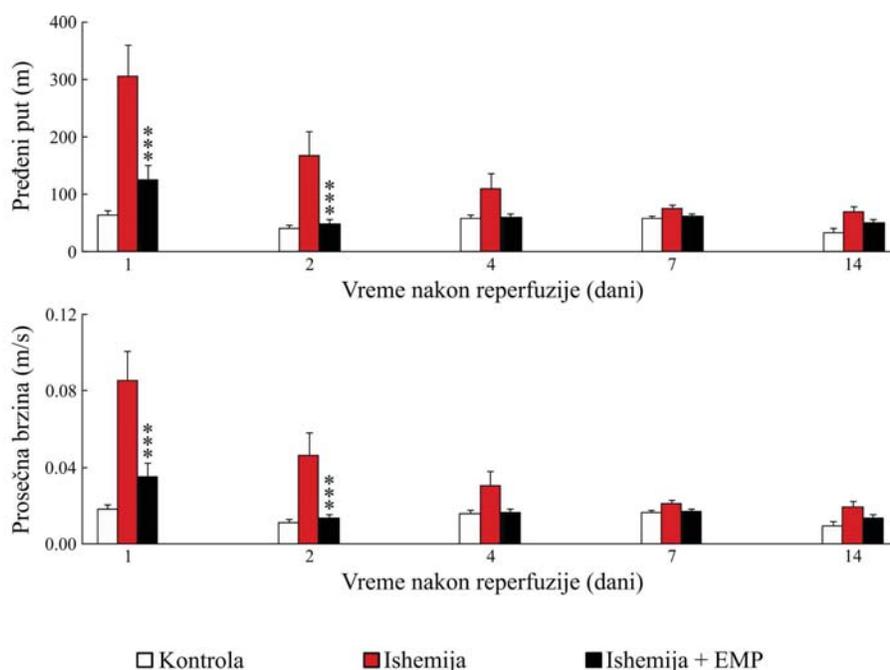
**Tabela 4.** Značajne razlike u ponašanju pustinjских miševa podvrgnutih 10-min globalnoj moždanoj ishemiji bez i sa izlaganjem EMP (0,5 mT, 50 Hz, 7 dana) u različitim vremenima nakon reperfuzije

		Pređeni put	Prosečna brzina	Stereotipija	Rotacije u smeru kazaljke na satu	Rotacije suprotno od smera kazaljke na satu	Mirovanje
Ishemija	1. vs 2. dan	***	***	***	***	***	**
	1. vs 4. dan	***	***	***	***	***	***
	1. vs 7. dan	***	***	***	***	***	***
	1. vs 14. dan	***	***	***	***	***	***
	2. vs 4. dan	*	*	*			
	2. vs 7. dan	***	***	***	**	*	
	2. vs 14. dan	***	***	***	*	**	
	Ishemija + EMP	1. vs 2. dan	**	**	**	*	*
1. vs 4. dan		*	*	*		*	
1. vs 7. dan		*	*	*			
1. vs 14. dan		**	**	**	*	**	*

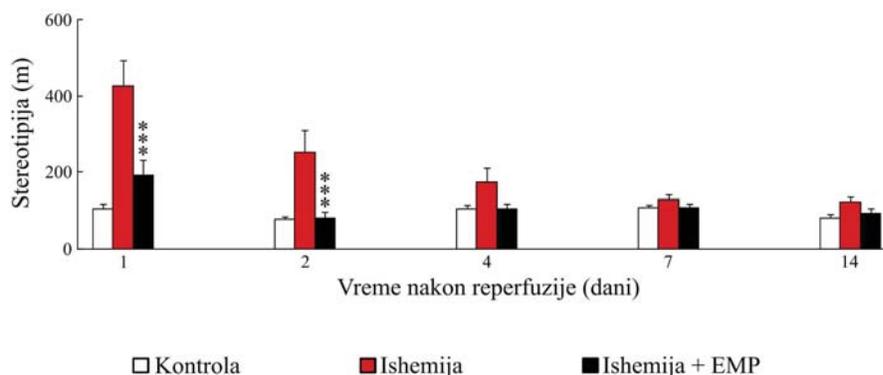
\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  i \*\*\* $p < 0,001$  (dvofaktorijalna analiza varijanse praćena LSD testom)

Kod ishemićnih životinja primenjeno EMP pokazuje snažan efekat u smislu smanjenja hipermotorne aktivnosti. Pustinjski miševi sa eksperimentalno izazvanom ishemijom koji su bili izloženi EMP su imali značajno povećanu lokomociju (slika 16.), stereotipiju (slika 17.) i rotacije (slika 18.) samo 1. dana nakon reperfuzije kada je inače postishemijska hiperaktivnost najizraženija (tabele 3. i 4.). Pa ipak, ova motorna hiperaktivnost je bila

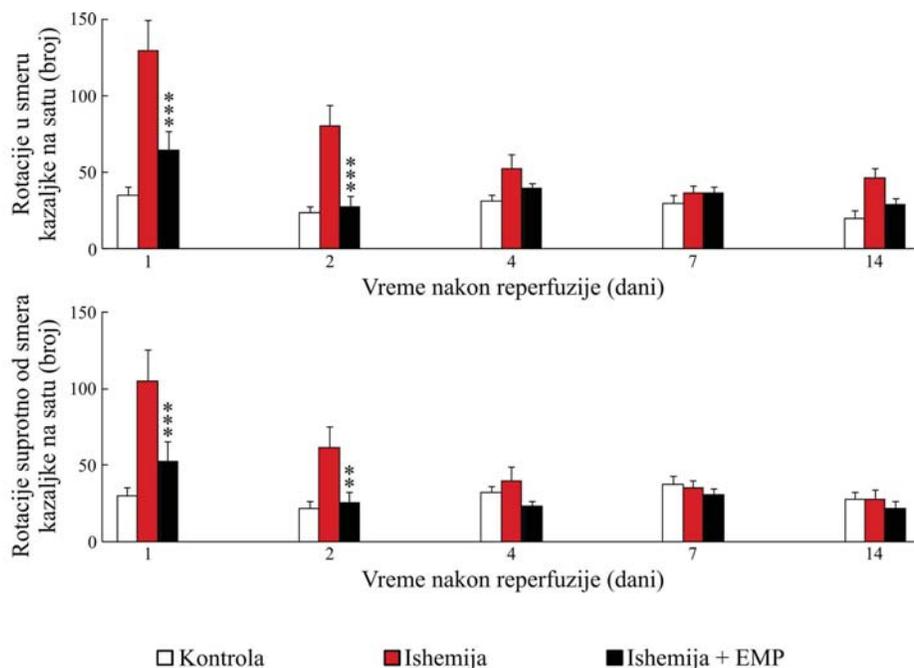
značajno manja, nego kod ishemičnih životinja koje nisu bile izlagane EMP, 1. i 2. dana nakon reperfuzije (slike 16-19).



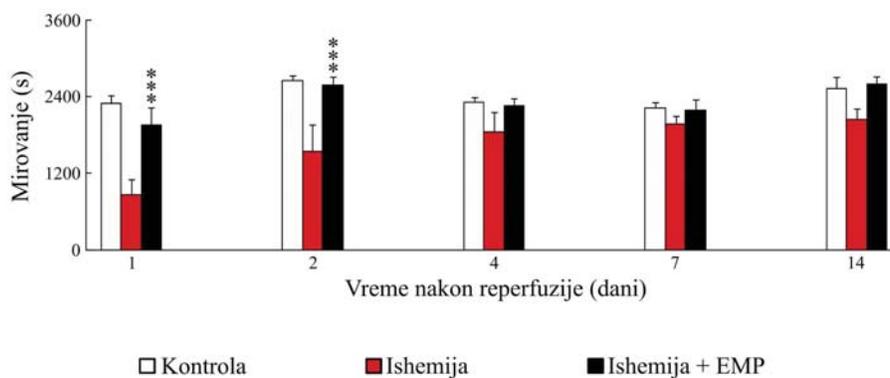
**Slika 16.** Efekat kontinuiranog 7-dnevnog izlaganja EMP (0,5 mT, 50 Hz) na lokomociju pustinskih miševa podvrgnutih 10-min globalnoj moždanoj ishemiji. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=6-8 životinja po grupi). \*\*\*p<0,001 predstavlja značajnu razliku u poređenju sa ishemičnom grupom (dvofaktorijalna analiza varijanse praćena LSD testom).



**Slika 17.** Efekat kontinuiranog 7-dnevnog izlaganja EMP (0,5 mT, 50 Hz) na stereotipiju pustinskih miševa podvrgnutih 10-min globalnoj moždanoj ishemiji. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=6-8 životinja po grupi). \*\*\*p<0,001 predstavlja značajnu razliku u poređenju sa ishemičnom grupom (dvofaktorijalna analiza varijanse praćena LSD testom).



**Slika 18.** Efekat kontinuiranog 7-dnevnog izlaganja EMP (0,5 mT, 50 Hz) na rotacije u smeru i suprotno od smeru kazaljke na satu kod pustinjских miševa podvrgnutih 10-min globalnoj moždanoj ishemiji. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=6-8 životinja po grupi). \*\*p<0,01 i \*\*\*p<0,001 predstavljaju značajne razlike u poređenju sa ishemičnom grupom (dvofaktorijalna analiza varijanse praćena LSD testom).



**Slika 19.** Efekat kontinuiranog 7-dnevnog izlaganja EMP (0,5 mT, 50 Hz) na mirovanje pustinjских miševa podvrgnutih 10-min globalnoj moždanoj ishemiji. Rezultati u predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=6-8 životinja po grupi). \*\*\*p<0,001 predstavlja značajnu razliku u poređenju sa ishemičnom grupom (dvofaktorijalna analiza varijanse praćena LSD testom).

## 4.2. Efekti EMP (0,5 mT, 50 Hz) na morfološke karakteristike mozga pustinskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom

Rezultati istraživanja su pokazali da nije bilo uočljivih promena u morfologiji i ćelijskoj distribuciji u hipokampusu, striatumu i kori velikog mozga intaktnih, sham-operisanih i sham-izloženih pustinskih miševa (rezultati nisu prikazani), tako da su ovi pustinski miševi razmatrani kao jedna kontrolna grupa.

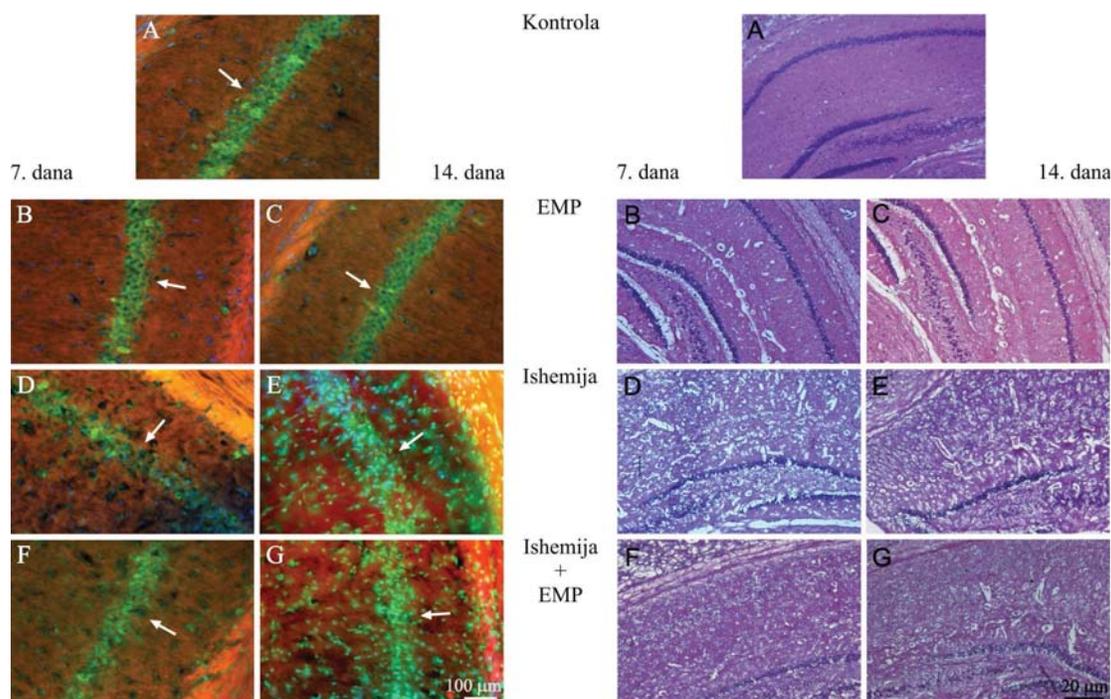
Nakon jednofaktorijalne analize varijanse bilo je očigledno da izlaganje EMP značajno utiče na volumensku gustinu FJ pozitivnih neurona ( $F_{(3,12)}=16,66$ ,  $p<0,01$ ,  $\eta_p^2=0,80$ ), volumensku gustinu GFAP obeleženih astrocita ( $F_{(6,27)}=2,99$ ,  $p<0,05$ ,  $\eta_p^2=0,40$ ) i broj Iba1 obeleženih mikroglijalnih ćelija po jedinici površine ( $F_{(6,24)}=4,98$ ,  $p<0,01$ ,  $\eta_p^2=0,55$ ) u hipokampusu pustinskih miševa podvrgnutih 10-min globalnoj moždanoj ishemiji.

### 4.2.1. Hipokampus-histološke i morfometrijske karakteristike

Kako bi imali uvid u citoarhitekturu hipokampalnog CA1 regiona, preseci mozga su trostruko obojeni fluorescentnom Nissl bojom (NeuroTrace, zeleno) kako bi se vizualizovao citosol neurona (vezuje se i za jedarnu DNK i ribozomalnu RNK u citosolu), fluorescentnim trejserom za ćelijske membrane (Dil, crveno) i fluorescentnim markerom jedara (DAPI, plavo). Takođe u istu svrhu je i urađeno hematoksilin/eozin klasično bojenje (slika 21.).

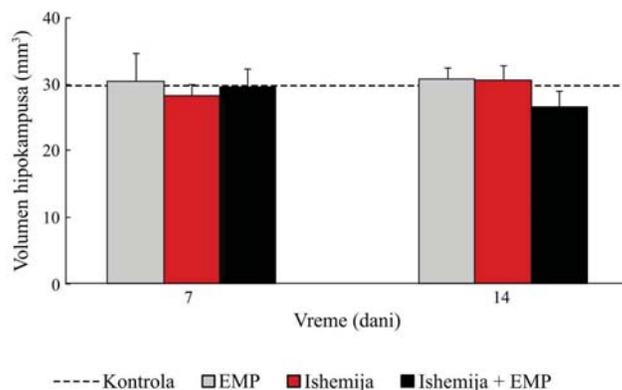
U kontrolnoj (slika 21 A) i EMP grupi (analiziranoj neposredno i 7 dana nakon prestanka izlaganja EMP; slike 21 B i C) hipokampus pokazuje klasične morfološke karakteristike jasno ograničenog CA1 sloja sa gusto pakovanim piramidalnim neuronima, normalnog parenhima. Nakon 10-min ishemije uočene su promene u hipokampalnom CA1 regionu u vidu smanjenog broja

neurona i delinearizovanog piramidalnog sloja i to kako 7. tako i 14. dana nakon reperfuzije (slike 21 D i E). Parenhim nije kompaktan kao u kontrolnoj grupi. Isti efekti su uočeni i u hipokampusu ishemičnih pustinjskih miševa izloženih EMP (slike 21 F i G).



**Slika 21.** NeuroTrace/Dil/DAPI (levo) i hematoksilin/eozin (desno) bojenje CA1 regiona hipokampusa pustinjskog miša. Kontrolna grupa (A); EMP grupa neposredno (B) i 7 dana nakon prestanka izlaganja (C); Ishemična grupa 7. dana (D) i 14. dana nakon reperfuzije (E); Ishemija + EMP grupa neposredno (7. dan nakon reperfuzije, F) i 7 dana nakon prestanka izlaganja (14. dan nakon reperfuzije, G). Strelice pokazuju CA1 region. Zeleno - NeuroTrace obeleženi neuroni; crveno - Dil obeležene membrane; plavo - DAPI obeležena jedra.

Analiza volumena hipokampusa (slika 20.) pokazala je da ne postoje značajne razlike između eksperimentalnih grupa. Vrednosti izmerenog volumena su u opsegu 26.6-30.7 mm<sup>3</sup>.



**Slika 20.** Volumen hipokampusa je prikazan kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=4-5 životinja po grupi).

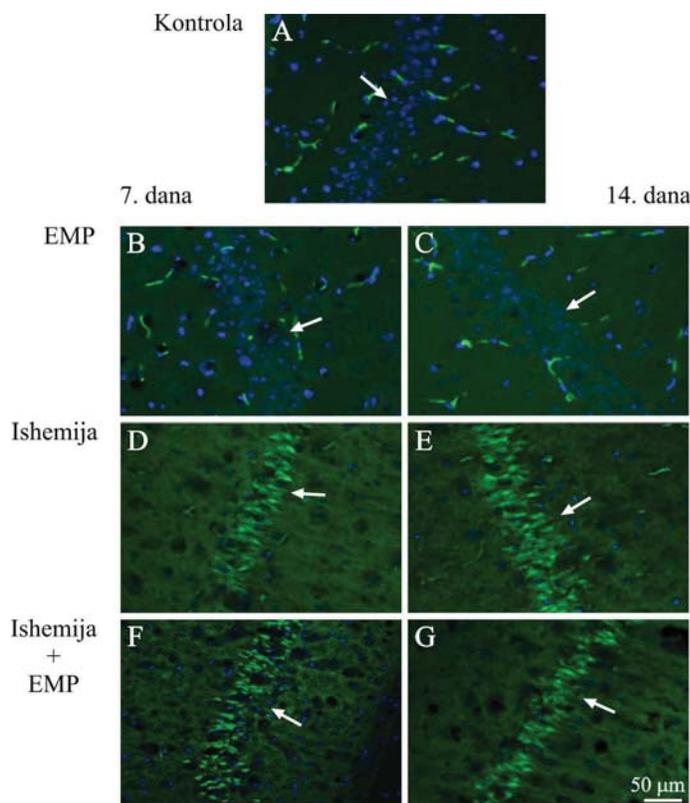
**Tabela 5.** Volumeni regiona hipokampusa (mm<sup>3</sup>) predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=4-5 životinja po grupi)

	CA1	CA2	CA3	DG	ostalo
Kontrola	10,1 $\pm$ 1,42	0,78 $\pm$ 0,01	3,97 $\pm$ 0,43	12,10 $\pm$ 0,61	2,70 $\pm$ 0,50
7. dan					
EMP	10,60 $\pm$ 2,13	0,40 $\pm$ 0,01	5,42 $\pm$ 0,13	13,2 $\pm$ 1,8	2,58 $\pm$ 0,18
Ishemija	8,32 $\pm$ 0,50	1,25 $\pm$ 1,34	4,79 $\pm$ 0,59	13,1 $\pm$ 1,32	0,93 $\pm$ 0,19
Ishemija+EMP	10,80 $\pm$ 1,07	1,00 $\pm$ 4,15	5,66 $\pm$ 0,36	11,80 $\pm$ 1,62	1,46 $\pm$ 0,07
14. dan					
EMP	11,50 $\pm$ 1,04	0,56 $\pm$ 0,02	5,06 $\pm$ 0,10	11,50 $\pm$ 0,98	1,58 $\pm$ 0,04
Ishemija	9,82 $\pm$ 0,49	0,96 $\pm$ 0,02	5,61 $\pm$ 0,34	11,90 $\pm$ 1,10	1,13 $\pm$ 0,02
Ishemija+EMP	9,80 $\pm$ 0,13	0,36 $\pm$ 0,04	4,76 $\pm$ 0,57	10,5 $\pm$ 2,74	2,64 $\pm$ 0,02

Analiza pojedinačnih regiona (CA1, CA2, CA3, DG) u hipokampusu takođe pokazuje da ne postoje statistički značajne razlike između analiziranih eksperimentalnih grupa (tabela 5).

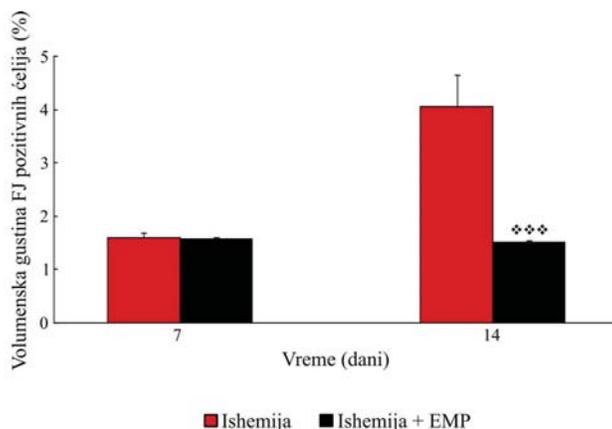
#### 4.2.1.1. Efekat EMP na hipokampalne neurone u mozgu pustinskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom-kvantifikacija FJ obeleženih neurona

FJ bojenje je korišćeno da bi se stekla bolja morfološka procena o odnosu živih i oštećenih nervnih ćelija. U kontrolnoj grupi nema FJ pozitivnih ćelija (slika 22 A), kao ni u EMP grupi neposredno i 7 dana nakon prestanka izlaganja (slike 22 B i C) već su samo vidljiva DAPI obeležena jedra neurona i zeleno obeleženi kapilari. Nakon reperfuzije 7. i 14. dana, FJ bojenje u hipokampusu pokazuje postojanje oštećenih neurona u CA1 regionu ishemičnih pustinskih miševa bez (slike 22 D i E) i sa izlaganjem EMP (slike 22 F i G).



**Slika 22.** FJ bojenje hipokampusa pustinskog miša. Kontrolna grupa (A); EMP grupa neposredno (B) i 7 dana nakon prestanka izlaganja (C); Ishemična grupa 7. dana (D) i 14. dana nakon reperfuzije (E); Ishemija + EMP grupa neposredno (7. dan nakon reperfuzije, F) i 7 dana nakon prestanka izlaganja (14. dan nakon reperfuzije, G). Strelice pokazuju CA1 region. Zeleno - FJ pozitivne ćelije; plavo - DAPI obeležena jedra.

Najveći broj FJ pozitivnih ćelija je uočen kod ishemičnih pustinjskih miševa 14. dana nakon reperfuzije (slika 23.). Step en umirućih neurona kod ovih životinja je bio značajno viši u poređenju sa ishemičnim pustinjskim miševima izloženim EMP 14. dana nakon reperfuzije. Takođe, to je bilo značajno povećanje i u odnosu na ishemične životinje analizirane 7. dana nakon reperfuzije ( $p < 0.001$ ).



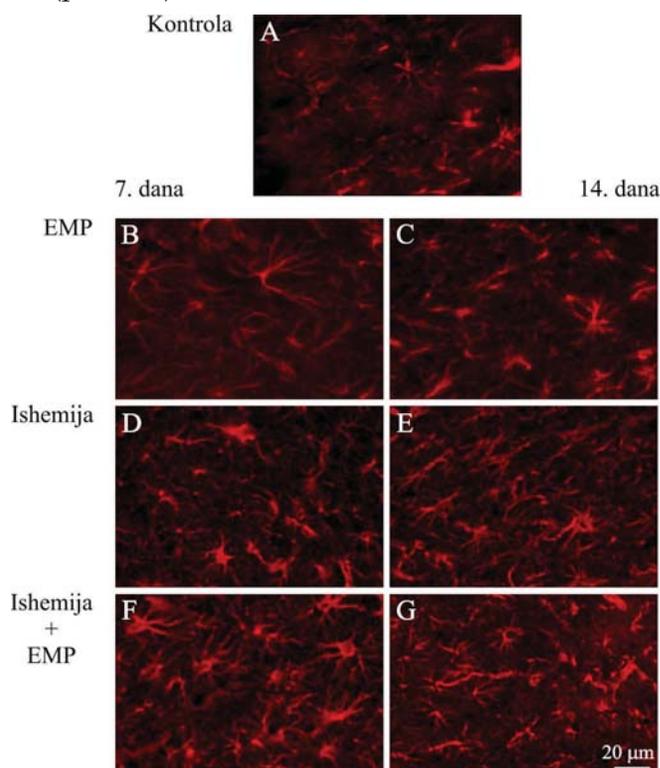
**Slika 23.** Volumenska gustina FJ pozitivnih neurona u hipokampusu pustinjskog miša. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=4-5$  životinja po grupi). \*\*\* $p < 0,001$  u poređenju sa ishemičnom grupom (jednofaktorijalna analiza varijanse praćena LSD testom).

#### 4.2.1.2. Efekat EMP na morfologiju i broj astrocita u hipokampusu pustinjskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom

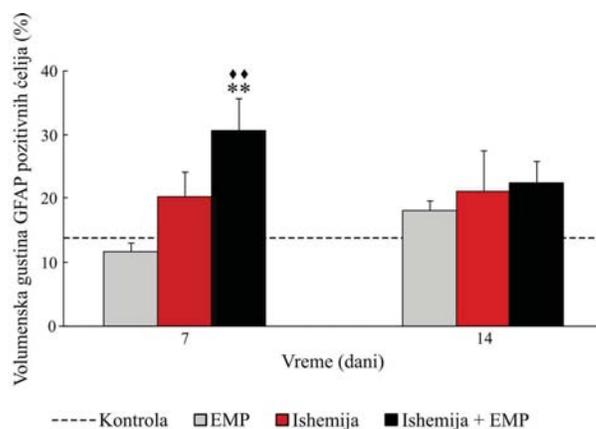
GFAP obeleženi astrociti imaju morfologiju koja je karakteristična za stanje mirovanja - malo ćelijsko telo sa dugim nastavcima u kontrolnoj grupi (slika 24 A), kao i u EMP grupi analiziranoj neposredno (slika 24 B) i 7 dana nakon prestanka izlaganja (slika 24 C). U grupi ishemičnih pustinjskih miševa GFAP imunoreaktivnost je bila veća i astrociti su imali kraće i deblje nastavke 7. dana (slika 24 D) i 14. dana nakon reperfuzije (slika 24 E). Značajna aktivacija astrocita je uočena u grupi ishemičnih pustinjskih miševa izloženih EMP 7.

dana nakon reperfuzije (neposredno nakon prestanka izlaganja, slika 24 F), dok su 14. dana nakon reperfuzije astrociti slični onima iz grupe ishemičnih životinja (slika 24 G).

Volumenska gustina GFAP pozitivnih astrocita povećana je kod ishemičnih pustinjaških miševa, posebno onih izloženih EMP (slika 25). 7. dana nakon reperfuzije, uočeno povećanje kod ishemičnih životinja izloženih EMP je bilo značajno u poređenju sa kontrolnom i EMP grupom. Takođe, volumenska gustina astrocita kod ovih životinja je bila veća u odnosu na ishemične životinje koje nisu bile izlagane EMP ( $p=0,052$ ). 14. dana nakon reperfuzije, kod sve tri eksperimentalne grupe uočena je veća gustina astrocita u odnosu na kontrolnu grupu, pri čemu su promene bile najizraženije kod ishemičnih životinja izloženih EMP ( $p=0,064$ ).



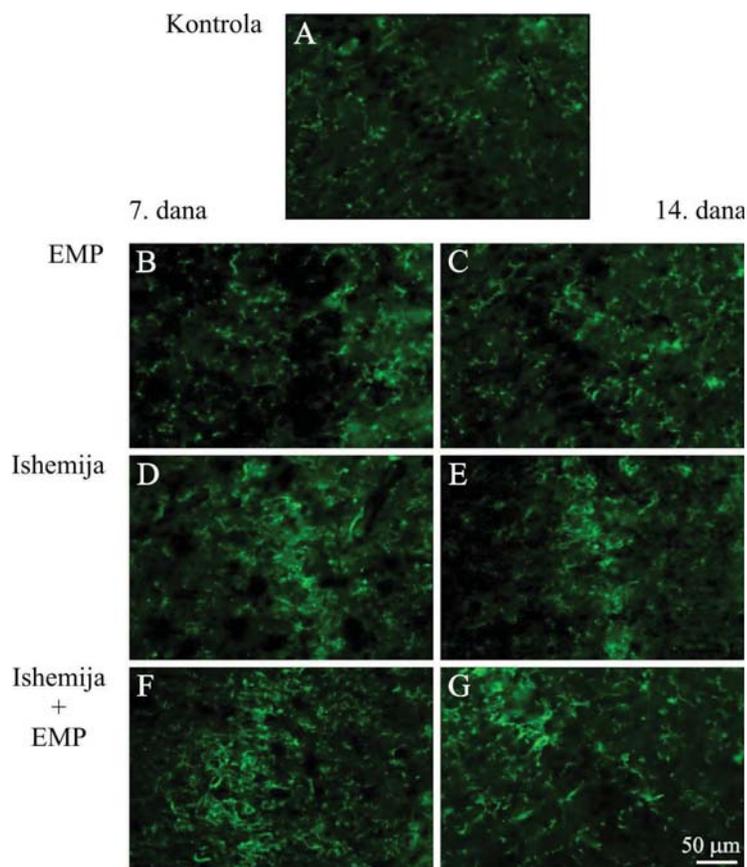
**Slika 24.** GFAP bojenje astrocita u hipokampusu pustinjaškog miša. Kontrolna grupa (A); EMP grupa neposredno (B) i 7 dana nakon prestanka izlaganja (C); Ishemična grupa 7. dana (D) i 14. dana nakon reperfuzije (E); Ishemija + EMP grupa neposredno (7. dan nakon reperfuzije, F) i 7 dana nakon prestanka izlaganja (14. dan nakon reperfuzije, G). Crveno - GFAP pozitivni astrociti.



**Slika 25.** Volumenska gustina astrocita u hipokampusu pustinjskog miša. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=4-5 životinja po grupi). \*\*p<0,01 u poređenju sa kontrolnom grupom, \*\*\*p<0,01 u poređenju sa EMP grupom (jednofaktorijalna analiza varijanse praćena LSD testom).

#### 4.2.1.3. Efekat EMP na morfologiju i broj mikroglijalnih ćelija u hipokampusu pustinjčkih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom

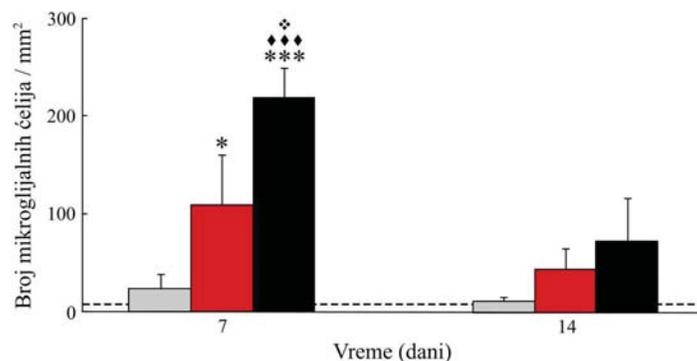
Iba 1 (jonizovani kalcijum vezujući adaptorni molekul) bojenje je korisno za obeležavanje mikroglijalnih ćelija. U kontrolnoj grupi (slika 26 A), kao i u EMP grupi analiziranoj neposredno (slika 26 B) i 7 dana nakon prestanka izlaganja (slika 26 C), mikroglijalne ćelije pokazuju morfologiju i distribuciju tipičnu za stanje mirovanja - malo telo i kratki ramifikovani nastavci. 7. dana nakon reperfuzije, mikroglijalne ćelije zadobijaju ameboidnu morfologiju što je najizraženije u ishemičnoj grupi (slika 26 D) u poređenju sa kontrolnom i EMP grupom. 14. dana nakon reperfuzije, mikroglijalne ćelije su i dalje aktivirane ali u manjem stepenu (slika 26 E). U grupi ishemičnih pustinjčkih miševa izloženih EMP mikroglijalne ćelije pokazuju jaku aktivaciju 7. dana nakon reperfuzije (slika 26 F), dok je njihov nivo imunoreaktivnosti sličan kao u ishemičnoj grupi 14. dana nakon reperfuzije (slika 26 G).



**Slika 26.** Iba1 bojenje u hipokampusu pustinjačkog miša. Kontrolna grupa (A); EMP grupa neposredno (B) i 7 dana nakon prestanka izlaganja (C); Ishemična grupa 7. dana (D) i 14. dana nakon reperfuzije (E); Ishemija + EMP grupa neposredno (7. dan nakon reperfuzije, F) i 7 dana nakon prestanka izlaganja (14. dan nakon reperfuzije, G). Zeleno - Iba1 pozitivne mikroglijalne ćelije.

Analiza broja mikroglijalnih ćelija po jedinici površine (slika 27.) pokazuje značajno povećanje kod ishemičnih pustinjačkih miševa, naročito onih izloženih EMP, u poređenju sa kontrolom 7. dana nakon reperfuzije. Uočeno povećanje u ishemičnoj grupi izloženoj EMP je bilo značajno i u poređenju sa EMP i ishemičnom grupom 7. dana nakon reperfuzije. Takođe, postoji značajna razlika ( $p < 0.01$ ) između ishemičnih pustinjačkih miševa izloženih EMP i analiziranih 7. i 14. dana nakon reperfuzije. 14. dana nakon reperfuzije (slika

27.) broj Iba 1 obeleženih mikroglijalnih ćelija je bio povećan kod ishemičnih životinja bez i sa izlaganjem EMP u poređenju sa kontrolnom i EMP grupom, ali neznačajno i sa istim trendom promene kao 7. dana nakon reperfuzije.



**Slika 27.** Broj mikroglijalnih ćelija po jedinici površine u hipokampusu pustinjačkog miša. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=4-5 životinja po grupi). \*p<0,05 i \*\*\*p<0,001 u poređenju sa kontrolnom grupom; \*\*\*p<0,001 u poređenju sa EMP grupom; \*p<0,05 u poređenju sa ishemičnom grupom (iednofaktoriialna analiza variianse vraćena

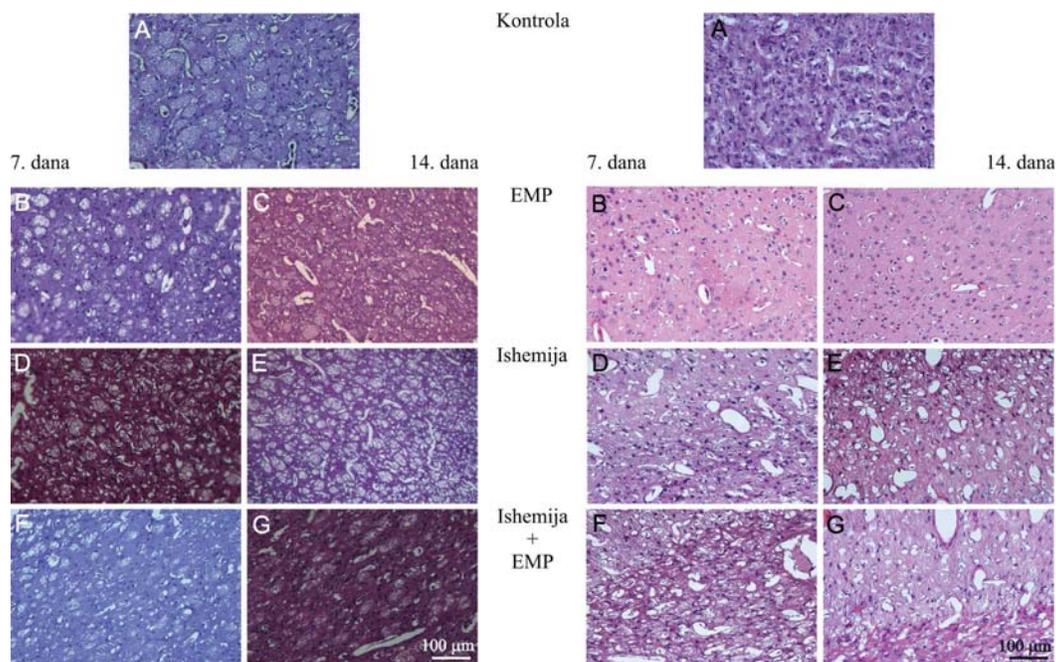
#### 4.2.2. Histološke i morfometrijske karakteristike striatuma i kore velikog mozga

U cilju histološke analize promena u striatumu i kori velikog mozga (primarni motorni, sekundarni somatosenzorni i insularni korteks) izvršili smo bojenja hematoxilin/eozin (slika 29.), kao i trostruko bojenje fluorescentnim markerima za neurone, membrane i jedro (slika 30.).

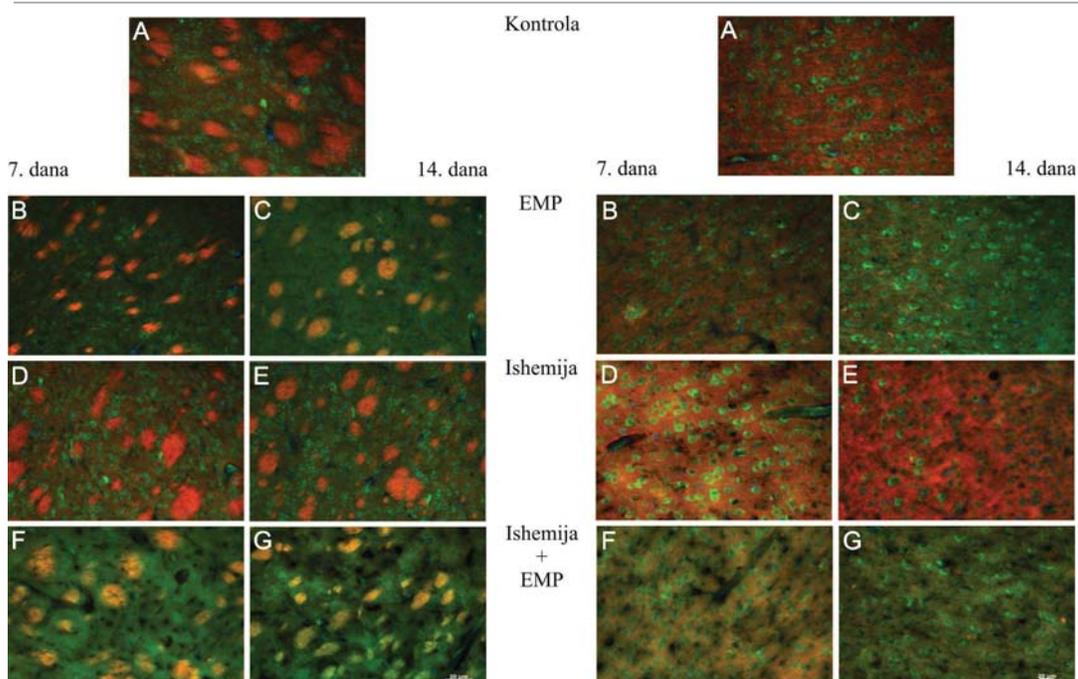
U striatumu kontrolne grupe (slike 29 A i 30 A, levi pano), kao i EMP grupe analizirane neposredno (slike 29 B i 30 B, levi pano) i 7 dana nakon prestanka izlaganja (slike 29 C i 30 C, levi pano), tkivo ima jasnu striozomatriks organizaciju. Nakon ishemije su jedva primetne promene u striatumu - matriks je rastresitiji, striozomi su veći, a neuroni triangularni i to kako 7. dana (slike 29 D i 30 D, levi pano) tako i 14. dana nakon reperfuzije (slike 29 E i 30 E, levi pano). Isti efekti su uočeni i u striatumu ishemičnih pustinjačkih miševa

izloženih EMP 7. dana (slike 29 F i 30 F, levi pano) i 14. dana nakon reperfuzije (slike 29 G i 30 G, levi pano).

U kori velikog mozga kontrolne grupe (slike 29 A i 30 A, desni pano), kao i EMP grupe analizirane neposredno (slike 29 B i 30 B, desni pano) i 7 dana nakon prestanka izlaganja (slike 29 C i 30 C, desni pano), tkivo je homogeno sa morfološki očuvanim neuronima. Nakon 10-min ishemije uočljive su promene u kori velikog mozga - parenhim je oštećen, sa dosta šupljina usled propadanja ćelija, a neuroni su smežurani i trouglasti i to kako 7. dana (slike 29 D i 30 D, desni pano) tako i 14. dana nakon reperfuzije (slike 29 E i 30 E, desni pano). Isti efekti su uočeni i u kori velikog mozga ishemičnih pustinjaških miševa izloženih EMP 7. dana (slike 29 F i 30 F, desni pano) i 14. dana nakon reperfuzije (slike 29 G i 30 G, desni pano).

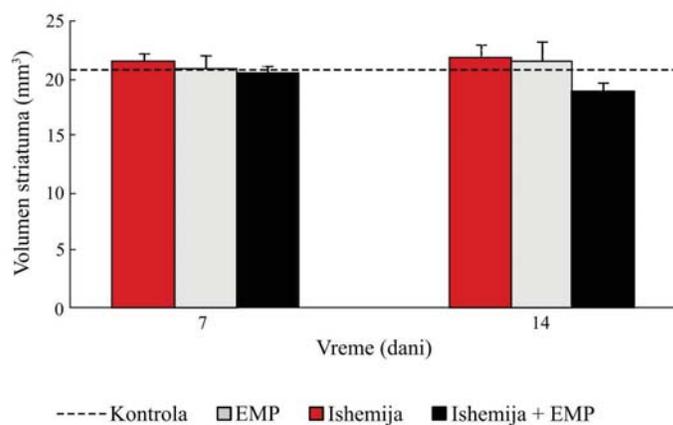


**Slika 29.** Hematoksilin/eozin bojenje striatuma (levi pano) i kore velikog mozga (desni pano) pustinjaškog miša. Kontrolna grupa (A); EMP grupa neposredno (B) i 7 dana nakon prestanka izlaganja (C); Ishemična grupa 7. dana (D) i 14. dana nakon reperfuzije (E); Ishemija + EMP grupa neposredno (7. dan nakon reperfuzije, F) i 7 dana nakon prestanka izlaganja (14. dan nakon reperfuzije, G).



**Slika 30.** NeuroTrace/Dil/DAPI bojenje striatuma (levi pano) i kore velikog mozga (desni pano) pustinskog miša. Kontrolna grupa (A); EMP grupa neposredno (B) i 7 dana nakon prestanka izlaganja (C); Ishemična grupa 7. dana (D) i 14. dana nakon reperfuzije (E); Ishemija + EMP grupa neposredno (7. dan nakon reperfuzije, F) i 7 dana nakon prestanka izlaganja (14. dan nakon reperfuzije, G). Zeleno - NeuroTrace obeleženi neuroni; crveno - Dil obeležene membrane; plavo - DAPI obeležena jedra.

Analiza volumena striatuma (slika 28., tabela 6.) pokazuje da ne postoje statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa. Vrednosti izmerenog volumena su bile u opsegu 18,97-21,95 mm<sup>3</sup>.



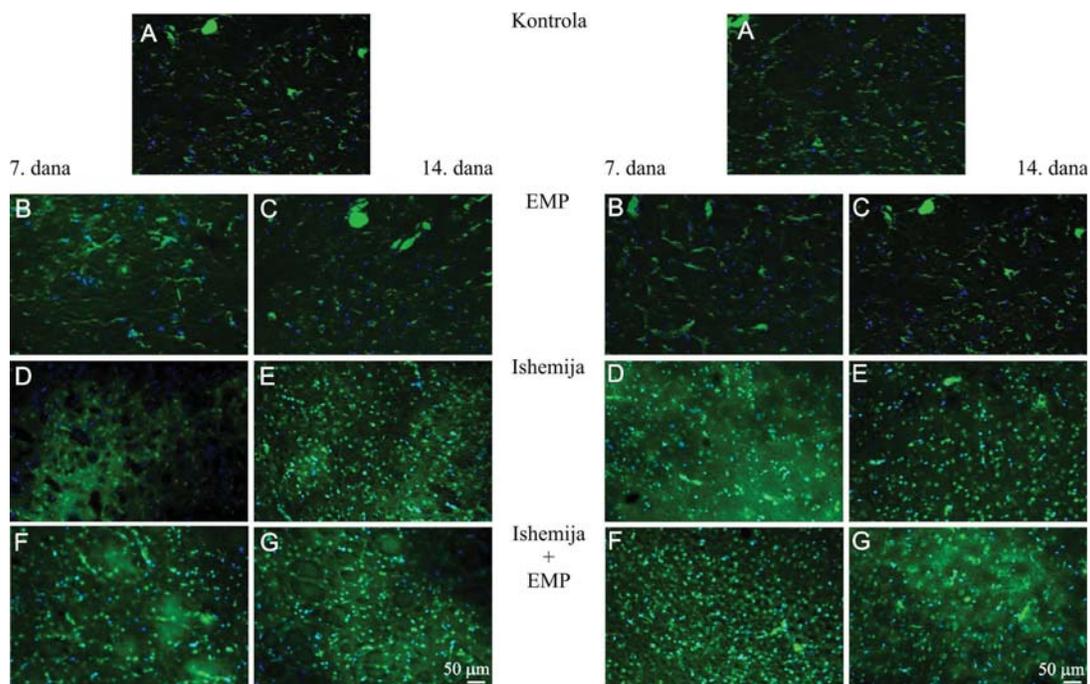
**Slika 28.** Volumen striatuma je predstavljen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=4-5 životinja po grupi).

**Tabela 6.** Volumen regiona striatuma ( $\text{mm}^3$ ) predstavljen kao srednja vrednost  $\pm$  srednja greška ( $n=4-5$  životinja po grupi). A - volumen kaudatus-putamena, B - volumen nukleus akumbensa i lateralnog globus palidusa.

	A	B
Kontrola	18,39 $\pm$ 0,44	4,49 $\pm$ 0,44
7. dan		
	A	B
EMP	19,75 $\pm$ 0,21	3,31 $\pm$ 0,22
Ishemija	20,48 $\pm$ 0,55	3,23 $\pm$ 0,20
Ishemija+EMP	19,14 $\pm$ 0,44	3,47 $\pm$ 0,22
14. dan		
EMP	18,71 $\pm$ 0,46	5,21 $\pm$ 0,29
Ishemija	19,38 $\pm$ 0,49	4,90 $\pm$ 0,13
Ishemija+EMP	18,30 $\pm$ 0,19	2,69 $\pm$ 0,15

#### 4.2.2.1. Efekat EMP na neurone u striatumu i kori velikog mozga pustinskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom - FJ obeleženi neuroni

Obeležavanje oštećenih neurona FJ nam je omogućilo bolji uvid u stepen oštećenja ove dve strukture za koje se zna da su posle hipokampusa najosetljivije na ishemijsku povredu. Jako mali broj pustinskih miševa kod kojih je konstatovana jasna degeneracija u hipokampalnom nivou ima uočljive FJ obeležene neurone u striatumu (slika 31., levi pano) i kori velikog mozga (slika 31., desni pano). I kada su FJ pozitivni, nalaze se u temporalnim regionima kore velikog mozga i dorzolateralnom striatumu. Usled nejednakog obrasca ispoljavanja nije bilo moguće kvantifikovati ove promene. Na osnovu fotomikrografija (slika 31.) možemo samo da konstatujemo postojanje oštećenih neurona u ove dve strukture kod ishemičnih pustinskih miševa, kao i ishemičnih pustinskih miševa izloženih EMP.



**Slika 31.** FJ bojenje striatuma (levi pano) i kore velikog mozga (desni pano) pustinjskog miša. Kontrolna grupa (A); EMP grupa neposredno (B) i 7 dana nakon prestanka izlaganja (C); Ishemična grupa 7. dana (D) i 14. dana nakon reperfuzije (E); Ishemija + EMP grupa neposredno (7. dan nakon reperfuzije, F) i 7 dana nakon prestanka izlaganja (14. dan nakon reperfuzije, G). Zeleno - FJ pozitivne ćelije; plavo - DAPI obeležena jedra.

#### 4.3. Efekti EMP (0,5 mT, 50 Hz) na parametre oksidativnog stresa pustinjačkih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom

Početnom statističkom analizom ustanovljeno je da ne postoje razlike u vrednostima parametara oksidativnog stresa intaktnih, sham-operisanih i sham-izloženih pustinjačkih miševa u okviru svakog merenja, tj. 7. i 14. dana od početka eksperimentalne procedure (rezultati nisu prikazani). Svi ovi podaci su akumulirani i izraženi kao jedna kontrolna vrednost.

Nakon jednofaktorijalne analize varijanse, dobijeni rezultati su pokazali da izlaganje EMP statistički značajno utiče na produkciju NO i O<sub>2</sub><sup>-</sup>, aktivnost SOD i ILP u mozgu (kora velikog mozga, striatum, hipokampus) pustinjačkih miševa podvrgnutih 10-min moždanoj ishemiji (tabela 7.).

**Tabela 7.** Jednofaktorijalna analiza varijanse

	Kora prednjeg mozga				Striatum			Hipokampus		
	df	F	p	$\eta_p^2$	F	p	$\eta_p^2$	F	p	$\eta_p^2$
NO	6	128.45	<0.001	0.95	37.38	<0.001	0.85	53.58	<0.001	0.89
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	6	63.61	<0.001	0.91	24.00	<0.001	0.79	20.75	<0.001	0.76
SOD	6	50.80	<0.001	0.87	44.56	<0.001	0.87	30.05	<0.001	0.82
ILP	6	20.50	<0.001	0.76	24.49	<0.001	0.79	27.17	<0.001	0.81

df - stepeni slobode;  $\eta_p^2$  - parcijalni eta-kvadrat

Primenjeno EMP takođe statistički značajno povećava produkciju slobodnoradikalnih vrsta u svim ispitivanim strukturama mozga 7. dana (neposredni efekat EMP) i to u značajno većoj meri nego ishemija (slike 32., 34., 35., tabela 8.). Za razliku od ishemije, 7-dnevno izlaganje EMP značajno povećava aktivnost SOD (slika 33., tabela 8.). Kod ovih životinja, 7 dana nakon završetka izlaganja (odloženi efekat EMP) izmerene vrednosti parametara oksidativnog stresa su na nivou kontrolnih (slike 32-35, tabela 8.).

Rezultati istraživanja pokazuju da ishemija dovodi do statistički značajnog povećanja oksidativnog stresa u svim ispitivanim strukturama mozga što se ogleda u povećanim vrednostima  $O_2^-$ , NO, i ILP (slike 32., 34., 35.) i to kako 7. tako i 14. dana nakon reperfuzije (tabele 8. i 9.). Aktivnost SOD kod ovih životinja (slika 33.) je bila na kontrolnom nivou (tabele 8. i 9.).

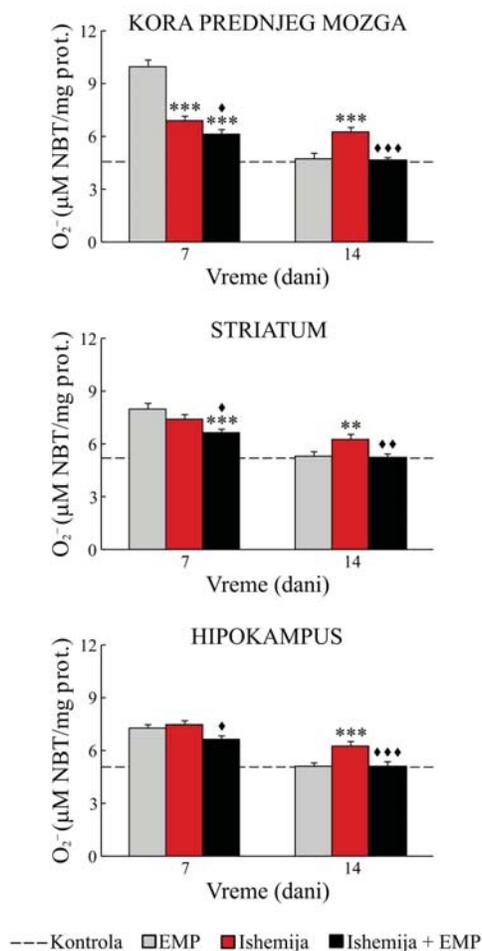
Ishemični pustinjski miševi izloženi EMP imaju takođe statistički značajno povećane vrednosti merenih parametara 7. dana nakon reperfuzije (neposredni efekat EMP), ali u znatno manjoj meri nego jedinke ishemične grupe ili grupe izložene EMP. 14. dana nakon reperfuzije parametri oksidativnog stresa u mozgu ishemičnih pustinjskih miševa izloženih EMP su na nivou kontrolnih (slike 32-35 , tabela 8.).

Produkcija  $O_2^-$  je bila povećana 7. dana nakon ishemije u svim testiranim moždanim strukturama u približno istoj meri dok je tretman EMP doprineo najvećoj produkciji ovog radikala u kori prednjeg mozga dok su striatum i hipokampus pokazali približno istu osetljivost (slika 32., tabela 8.).

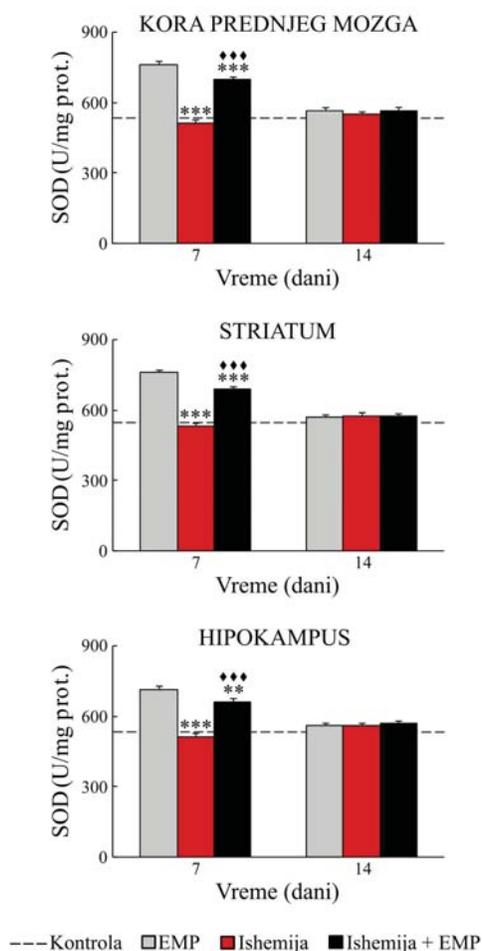
Aktivnost SOD je bila u istoj meri značajno povećana u svim ispitivanim strukturama 7. dana u grupi životinja izloženih EMP kao i grupi ishemičnih pustinjskih miševa izloženih EMP (slika 33., tabela 8.).

Produkcija NO kod ishemičnih pustinjskih miševa je bila povećana u nešto višoj meri u kori prednjeg mozga i hipokampusu nego u striatumu (7. i 14. dana), a u grupi životinja izloženih EMP u najvećoj meri u kori prednjeg mozga, potom hipokampusu i na kraju striatumu (7. dana) (slika 34., tabela 8.).

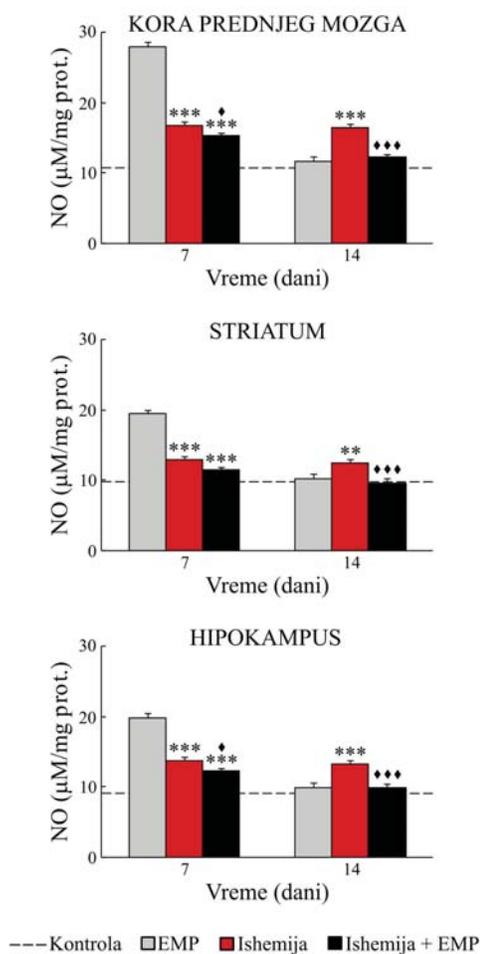
ILP je 7. dana povećan kod ishemičnih i miševa izloženih EMP u svim strukturama u približno istoj meri (slika 35., tabela 8.).



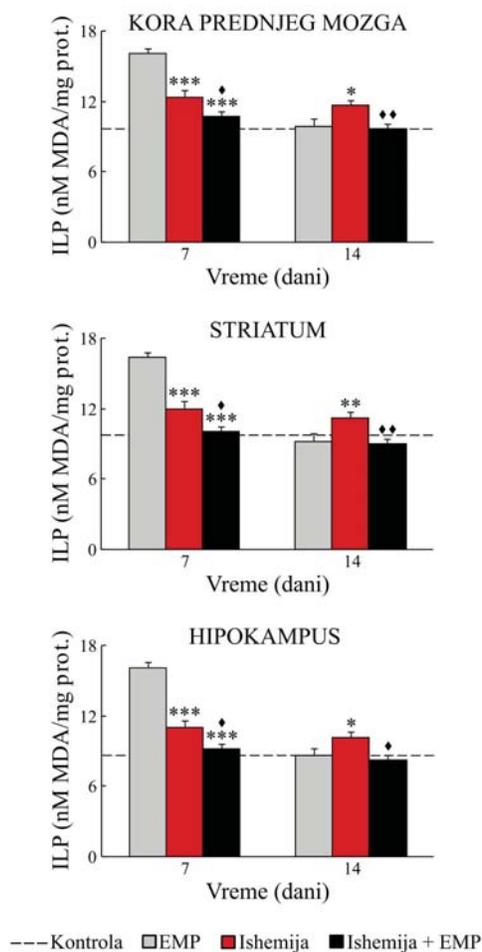
**Slika 32.** Neposredan (7. dan) i odloženi (14. dan) efekat kontinuiranog 7-dnevnog izlaganja EMP (0,5 mT, 50 Hz) na produkciju  $O_2^-$  pustinjačkih miševa podvrgnutih 10-min globalnoj moždanoj ishemiji. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=6-8$  životinja po grupi). \*\* $p<0,01$  i \*\*\* $p<0,001$  predstavljaju značajne razlike u poređenju sa EMP grupom; ♦ $p<0,05$ , ♦♦ $p<0,01$  i ♦♦♦ $p<0,001$  predstavljaju značajne razlike u poređenju sa ishemičnom grupom (jednofaktorijalna analiza varijanse praćena LSD testom).



**Slika 33.** Neposredan (7. dan) i odloženi (14. dan) efekat kontinuiranog 7-dnevnog izlaganja EMP (0,5 mT, 50 Hz) na produkciju SOD pustinjačkih miševa podvrgnutih 10-min globalnoj moždanoj ishemiji. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=6-8 životinja po grupi). \*\*\*p<0,001 predstavlja značajne razlike u poređenju sa EMP grupom; ◆◆◆p<0,001 predstavlja značajne razlike u poređenju sa ishemičnom grupom (jednofaktorijalna analiza varijanse praćena LSD testom).



**Slika 34.** Neposredan (7. dan) i odloženi (14. dan) efekat kontinuiranog 7-dnevnog izlaganja EMP (0,5 mT, 50 Hz) na produkciju NO pustinjskih miševa podvrgnutih 10-min globalnoj moždanoj ishemiji. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=6-8 životinja po grupi). \*\*p<0,01 i \*\*\*p<0,001 predstavljaju značajne razlike u poređenju sa EMP grupom; ♦p<0,05 i ♦♦♦p<0,001 predstavljaju značajne razlike u poređenju sa ishemičnom grupom (jednofaktorijalna analiza varijanse praćena LSD testom).



**Slika 35.** Neposredan (7. dan) i odloženi (14. dan) efekat kontinuiranog 7-dnevnog izlaganja EMP (0,5 mT, 50 Hz) na ILP pustinjских miševa podvrgnutih 10-min globalnoj moždanoj ishemiji. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=6-8 životinja po grupi). \*p<0,05, \*\*p<0,01 i \*\*\*p<0,001 predstavljaju značajne razlike u poređenju sa EMP grupom; ♦p<0,05 i ♦♦p<0,01 i predstavljaju značajne razlike u poređenju sa ishemičnom grupom (jednofaktorijalna analiza varijanse praćena LSD testom).

**Tabela 8.** A) Značajne razlike u vrednostima parametara oksidativnog stresa izmerenih 7. u odnosu na 14. dan od početka eksperimentalne procedure. B) Značajne razlike u parametrima oksidativnog stresa u odnosu na kontrolnu grupu. Cx - kora prednjeg mozga; S - striatum; Hipp - hipokampus. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  i \*\*\* $p < 0.001$  (jednofaktorijalna analiza varijanse praćena LSD testom).

A)			Cx	S	Hipp
NO	EMP	7. vs 14. dan	***	***	***
	Ishemija				
	Ishemija + EMP		***	*	**
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	EMP	7. vs 14. dan	***	***	***
	Ishemija			***	**
	Ishemija + EMP		***	***	***
SOD	EMP	7. vs 14. dan	***	***	***
	Ishemija		*	*	*
	Ishemija + EMP		***	***	***
ILP	EMP	7. vs 14. dan	***	***	***
	Ishemija				
	Ishemija + EMP				

B)

			7. dana			14. dana		
			Cx	S	Hipp	Cx	S	Hipp
NO	Kontrola vs.	EMP	***	***	***			
		Ishemija	***	***	***	***	***	***
		Ishemija + EMP	***	*	***	*		
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Kontrola vs.	EMP	***	***	***			
		Ishemija	***	***	***	***	***	***
		Ishemija + EMP	***	***	***			
SOD	Kontrola vs.	EMP	***	***	***			
		Ishemija						
		Ishemija + EMP	***	***	***	*		*
ILP	Kontrola vs.	ELF-MF	***	***	***			
		Ishemia	***	**	***	**	*	*
		Ishemia + ELF-MF						

## 5. DISKUSIJA

Ishemijsko oštećenje je povezano sa brojnim morfološkim i biohemijskim promenama u mozgu (Doyle i sar., 2008), kao i funkcionalnim promenama koje su uočene u studijama u kojima se prati ponašanje (Block, 1999). Na nivou ponašanja, postishemijsko oštećenje je praćeno motornom hiperaktivnošću koja je najizraženija prvog dana nakon ishemije, a potom postepeno opada do 5-7 dana nakon ishemičnog oštećenja (Kuroiwa i sar., 1991; Block i Schwarz 1996; Araki i sar., 2001; Yamamoto i sar., 2001; Janać i sar., 2006).

Postoji nekoliko manje ili više efikasnih strategija za prevazilaženje posledica moždane ishemije (Doyle i sar., 2008; Corbett i Nurse 1998; Dekanski i sar., 2011; Selaković i sar., 2010). Pa ipak, ne treba zaboraviti uticaj i sredinskih faktora na krajnji ishod ovog neuropatološkog stanja. Jedan od njih su svakako ENF magnetna polja (<300 Hz), poreklom od električnih uređaja i vodova, imajući u vidu njihovo sveprisustvo u životnoj sredini. Već je pokazano da ENF magnetna polja modulišu različite korake u sinaptičkoj transmisiji u mozgu, uključujući one koji leže u osnovi postishemijskog oštećenja, kao i motornog ponašanja organizama u fiziološkim i patofiziološkim stanjima (Grant i sar., 1994; Lai i Carino 1999; Sieroń i sar., 2001; Zhao i sar., 2003; Grassi i sar., 2004; Kinoshameg i Persinger 2004; Lee i sar., 2004; Shupak i sar., 2004; Janać i sar., 2005; Manikonda i sar., 2007; Shin i sar., 2007; Balassa i sar., 2009; Janać i sar., 2009; Nikolić i sar., 2010;).

Istraživanja koja se odnose na moguća mesta i načine delovanja EMP na CNS se intezivno sprovode. Za sada su ti rezultati često kontradiktorni što se tiče struktura CNS na koje EMP imaju najveći uticaj, kao i načina na koji mogu da se objasne eventualno nastale promene u strukturi i ponašanju (Ossenkopp i Ossenkopp, 1983; Lai i sar., 1998.).

Izlaganje ćelija ENF magnetnim poljima dovodi do promena u biosintezi proteina usled prenosa informacije kroz ćelijsku membranu putem enzimske kaskade (Goodman i sar., 1983; Philips i sar., 1992). Pokazano je da EMP stimulišu transkripciju, ali delujući ne direktno na ćelijske komponente već indirektno putem indukovanog električnog polja. Pošto EMP prolaze nesmetano kroz membranu, membranski procesi nisu neophodni da bi signal stigao do DNK u jedru i stimulisao sintezu kao odgovor na stres (Goodman i sar., 1993).

Dejstvo EMP se može posmatrati i ispitivati od molekuskog nivoa, preko ćelija i organa do čitavog organizma. Iako nesmetano prolazi kroz membranu, svoje dejstvo na organizam EMP može da ostvari delujući na ćelijske membrane zbog njihove specifične građe, a posebno membrane ekscitabilnih ćelija kao što su nervne, srčane i mišićne (Wolke i sar., 1998; Stuchly i Dawson, 2000). Ekscitabilne ćelije se karakterišu i konduktivnošću, tj. provođenjem naelektrisanja a kako je dobro poznata činjenica da su električno i magnetno polje tesno povezani, jasno je da dolazi do interakcije EMP i membrane. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup> kanali su mesta u membranama koja omogućavaju razmenu naelektrisanja usled čega dolazi do niza promena u ćelijama, a mogu se odnositi na transmisiju, sintezu proteina i njihovih produkata. Takođe i interćelijska sredina sadrži različite jone koji se u fiziološkim uslovima nalaze u stanju ravnoteže i oni mogu biti mesta na koja deluju EMP. Pošto je iz literature poznato da EMP primarno utiču na fluks jona Ca<sup>2+</sup> (Liburdy i sar., 1993; Karabakhtsian i sar., 1994; Barbier i sar., 1996; Huang i sar., 2000), možemo pretpostaviti da su uočene promene u ispitivanim regijama mozga i motornom ponašanju indirektna posledica uticaja EMP na ove jone. Dakle, ispitivanjem fluksa Ca<sup>2+</sup> bi se dobili značajni podaci koji bi išli u prilog ili nasuprot ove hipoteze.

### **5.1. Uticaj EMP (0,5 mT, 50 Hz) na motorno ponašanje pustinjskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom**

Studije u kojima se prati ponašanje su veoma korisne za detektovanje funkcionalnih promena. Ove studije su važne i za procenu ishemijskog oštećenja i neuroprotekcije, zbog toga što globalna moždana ishemija dovodi do promena u motornoj aktivnosti, učenju i pamćenju. Testovi koji su najčešće u upotrebi su test otvorenog polja - „open field” (motorna aktivnost), radijalni i vodeni lavirint (učenje i pamćenje). U našim istraživanjima je korišćen “open field” test, koji se pokazao kao vrlo pogodan za procenu efekata različitih farmakoloških supstanci, eksperimentalnih postavki i sredinskih faktora na motornu aktivnost.

EMP menja ponašanje, uglavnom povećanjem lokomotorne i eksploratorne aktivnosti (Smith i Justesen, 1977; Ossenkopp i Ossenkopp, 1983; Rudolf i sar., 1985). Međutim, neki naučnici su koristeći magnetna polja različitih karakteristika (50 Hz, 46 mT) uočili smanjenje iritabilnosti i uspešnosti izvršenja zadataka u testovima učenja i pamćenja (Trzeciak i sar., 1993). Izlaganje EMP (40 Hz, 10 mT) redukuje lokomotornu aktivnost i poboljšava prostornu orijentaciju u vodenom lavirintu kod pacova (Mrowiec i sar., 1994). Takođe, u studijama sa 50 Hz EMP, ako je primenjeno na početku svetlog perioda, povećava češkanje, lokomociju i defekaciju u određenoj meri, dok tokom tamne faze nije bilo nikakvih promena kod pacova (Rudolph i sar., 1985).

Za procenu dejstva EMP na motorno ponašanje ishemičnih životinja praćeni su lokomocija, stereotipija, rotacije i vreme mirovanja, parametri za koje je poznato da su promenjeni kod životinja sa moždanom ishemijom i za koje možemo reći da su sigurni pokazatelji tj. markeri ovog stanja. Svi ovi parametri

se ponašaju isto u smislu povećanja vrednosti kod ishemičnih životinja osim vremena mirovanja koje se smanjuje.

Do sada nisu rađena istraživanja efekta EMP na eksperimentalnom modelu moždane ishemije, niti sa eksperimentalnim dizajnom kao što je naš. Ima literaturnih podataka uglavnom na modelu fokalne ali ne i globalne moždane ishemije (Robertson i sar., 2007), a efekti neposrednog i odloženog efekta EMP do sada nisu paralelno izučavani.

Najznačajniji rezultat naših istraživanja je da primenjeno EMP (0,5 mT, 50 Hz) redukuje motornu hiperaktivnost pustinjačkih miševa koji su bili podvrgnuti 10-min globalnoj moždanoj ishemiji. Njihova motorna aktivnost je bila na kontrolnom nivou već drugog dana nakon reperfuzije (neposredan efekat EMP). Na tom nivou je ostala do kraja izlaganja EMP, kao i sedam dana nakon završetka izlaganja (odloženi efekat EMP).

Naši rezultati su pokazali da 10-min globalna moždana ishemija dovodi do značajnog povećanja motorne aktivnosti (lokomocija, stereotipija i rotacije) i samim tim smanjenja vremena mirovanja sve do 4. dana nakon reperfuzije. Moždana ishemija izaziva mnoge morfo-funkcionalne promene u mozgu, a najosetljivije strukture na ovu vrstu povrede su hipokampus, striatum i kora velikog mozga, koji su između ostalog uključeni i u kontrolu motornog ponašanja (Bast i Feldon, 2003; Groenewegen, 2003; van der Knaap i Valk, 2005). Poznato je da patofiziologiju moždane ishemije karakteriše inicijalna ekscitotoksičnost izazvana influksom  $Ca^{2+}$ , praćena poremećenom sinaptičkom transmisijom i povećanom motornom aktivnošću. Naši rezultati su u skladu sa već objavljenim rezultatima koji na to ukazuju (Kuroiwa i sar., 1991; Block i Schwarz 1996; Araki i sar., 2001; Yamamoto i sar., 2001; Janać i sar., 2006) i mogu se povezati sa promenama u sinaptičkoj transmisiji izazvanim moždanom ishemijom u gore navedenim moždanim strukturama. Sa druge strane, redukovana intenzitet i trajanje motorne hiperaktivnosti kod ishemičnih

pustinjskih miševa izloženih EMP bi mogli biti posledica modulacije procesa koji se nalaze u osnovi postishemičnog funkcionalnog oštećenja i/ili motorne kontrole pod uticajem EMP.

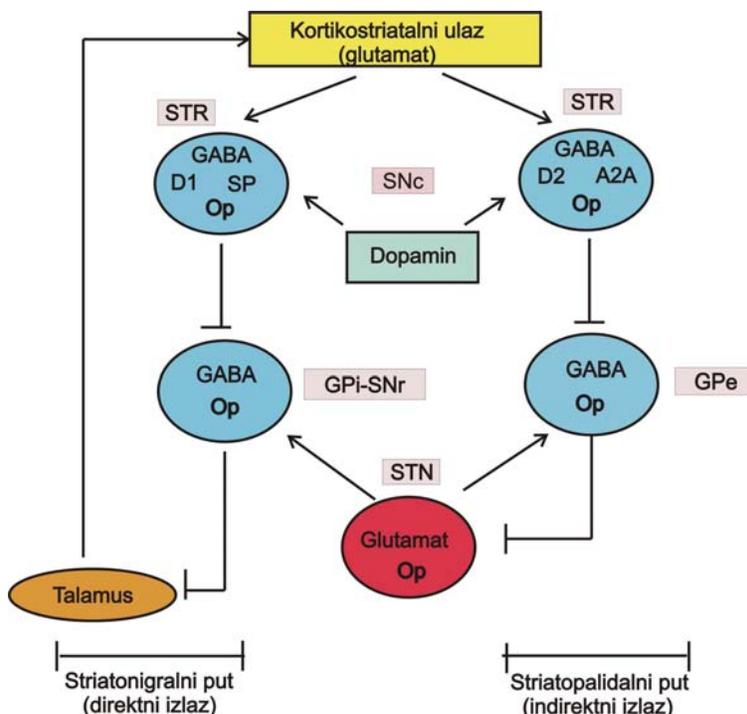
Manikoda i sar. (2007.) su pokazali da EMP (50 Hz, 50 i 100  $\mu$ T) povećava nivo unutarćelijskog  $\text{Ca}^{2+}$ , što posledično povećava aktivnost  $\text{Ca}^{2+}$  zavisnih protein kinaza C, cAMP zavisne protein kinaze i kalcineurina, kao i smanjuje aktivnost glutamatnih NMDA receptora u hipokampusu pacova. Takođe, povećan nivo  $\text{Ca}^{2+}$  stimuliše aktivnost  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin (CaM) zavisne kinaze. CaM je  $\text{Ca}^{2+}$  vezujući protein koji aktivira  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM zavisnu kinaznu signalizaciju u nervnim ćelijama.  $\text{Ca}^{2+}$  uzrokuje konformacione promene u CaM vezujući se za 4 mesta što je neophodno za interakciju i aktivaciju  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM zavisne kinaze. Postoji nekoliko tipova CaM kinaza i u zavisnosti od toga koja je više aktivirana zavise i efekti. Poznato je da inhibicija CaM kinaze redukuje volumen lezija u prolaznoj i trajnoj fokalnoj ishemiji (Kuroda i sar., 1997; Takagi i sar., 2001). CaM kinazaII je uključena u mnoge neuronalne funkcije kao što je sinteza i oslobađanje neurotransmitera, modulacija neuroreceptora i jonskih kanala, ekspresija gena i izrastanje neurita. CaM kinazaIV fosforiliše transkripcione faktore, uključujući CREB („cAMP responsive element binding protein“) namećući dalju regulatornu ulogu kroz fosforilaciju CREB vezujućeg proteina (CBP). CREB je povezan sa neuroprotekcijom u eksperimentalnim modelima moždanog udara (Walton i sar., 1996; Hu i sar., 1999). Takođe,  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM zavisna defosforilacija posredstvom kalcineurina ograničava sinaptičku transmisiju (Manikonda i sar., 2007). Kalcineurin je jedina protein fosfataza koja je aktivirana  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM u CNS, igrajući kritičnu ulogu u indukciji dugotrajne depresije zavisne od NMDA receptora i obezbeđujući link između regulacije  $\text{Ca}^{2+}$ , sinaptičke plastičnosti i ćelijskog preživljavanja. DARPP32 (dopamin-cAMP regulisani fosfoprotein), koji inhibira protein fosfatazu 1 uključenu u inaktivaciju NMDA receptora, je takođe defosforilisan

kalcineurinom. To obezbeđuje dodatni regulatorni mehanizam kontrole cAMP zavisne protein kinaze i funkcije NMDA receptora. Takođe, Wierasko (2004) je našao da izlaganje preseka hipokampusa pulsirajućem magnetnom polju povećava neuronsku ekscitabilnost na  $Ca^{2+}$  zavisan način, što se može odraziti na promene u sinaptičkoj transmisiji.

EMP različitih karakteristika utiču i na sinaptičku transmisiju dopamina, serotoninina, glutamata i acetilholina (Lai i Carino 1999; Sieroń i sar., 2001; Shin i sar., 2007; Janać i sar., 2009; Manikonda i sar., 2007), neurotransmitera odgovornih za regulaciju motornog ponašanja. Na osnovu dobijenih rezultata možemo pretpostaviti da je uočeno smanjenje motorne hiperaktivnosti izazvane ishemijom kod pustinjskih miševa izloženih EMP posledica direktne i/ili indirektno modulacije sinaptičke transmisije u bazalnim ganglijama. Jedna mogućnost je da dolazi do favorizovanja sinaptičke transmisije posredstvom GABAergičkih neurona indirektnog puta u bazalnim ganglijama (slika 36). Aktivacija ovog puta posredstvom glutamatergičkih neurona poreklom iz frontalnog korteksa inhibira talamus, što ima za posledicu smanjenje motorne aktivnosti. Druga mogućnost je da primarno dolazi do modulacije aktivnosti glutamatergičkih neurona kore velikog mozga koji se projektuju na bazalne ganglije (slika 36). Ovi rezultati su u skladu sa ranijim nalazima o specifičnim efektima akutnog izalaganja EMP (0,5 mT, 50 Hz, 7 dana) u mozgu pacova (Janać, 2007; Janać i sar., 2009). Pokazano je da primenjeno EMP uzrokuje promene samo u kori velikog mozga, modulišući aktivnost serotonergičkih 5HT<sub>2A</sub> receptora i sadržaj cAMP.

Uočeni efekti EMP na lokomociju ili kretanje i stereotipiju mogu se dovesti u vezu sa izmenjenom sinaptičkom transmisijom (prvenstveno dopaminergičkom) u nukleus akumbensu i striatumu, regionima bazalnih ganglija odgovornim za njihovu kontrolu (Moroz i sar., 1992; Hepp-Reymond i sar., 1997; Aldridge i sar., 2004). Uticaj EMP (0,5 mT, 50 Hz) na lokomociju i

stereotipiju, kao i dopaminergičku transmisiju je već pokazan u eksperimentima sa amfetaminom (Janać i sar., 2005). U prilog ovom su i rezultati Yamamoto i sar. (2001) koji su predložili da inhibicija hiperaktivnosti izazvane ishemijom može biti postignuta kompletnom blokadom dopaminskih receptora neposredno nakon ishemije.



**Slika 36.** Mogući putevi za ostvarivanje depresornog uticaja EMP na hipermotorno ponašanje pustinskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom. D1 i D2-dopaminski receptori; GABA- $\gamma$ -aminobuterna kiselina; SP-supstanca P; STR-striatum; GPe-spoljašnji segment *globus palidusa*; GPi-SNr-izlazna jedra bazalnih ganglija (unutrašnji segment *globus palidusa-substantia nigra pars reticulata*; SNc-*substantia nigra pars compacta*; Op-opioidni receptori; STN-subtalamičko jedro; A2A-adenozinski receptor

Mnogi autori ukazuju na vezu između ishemijskog oštećenja i opioidne transmisije u mozgu, gde karakteristike ove interakcije zavise od vrste opioidnog peptida i tipa njegovog receptora (Tang, 1985; Birch i sar., 1991; Graham i sar., 1993; Héron i sar., 1996). Poznato je da se pojačano postishemijsko oštećenje i snažno oslobađanje dopamina mogu javiti kao

rezultat smanjenog nivoa dinorfina, a što je indukovano globalnom moždanom ishemijom (Héron i sar., 1996). Tretman antagonistom  $\mu$ -opioid receptora ima neuroprotektivni efekat u modelu globalne moždane ishemije kod pacova (Graham i sar., 1993). Sa druge strane, pre- i postishemijska aplikacija specifičnog agoniste  $\kappa$ -opioidnog receptora štiti od letalnih efekata pustinjske miševe podvrgnute 7-min bilateralnoj okluziji i redukuje razvoj hiperaktivnosti (Tang, 1985; Birch i sar., 1991). Ovo je povezano sa inhibicijom glutamatne ekscitotoksičnosti i provodljivosti za  $Ca^{2+}$  koja je prouzrokovana stimulacijom  $\kappa$ -opioidnih receptora. (Ventura i sar., 1992; Terman i sar., 2000). Takođe, ustanovljeno je da je neuroprotekcija na hipoksično/ishemični stres posredovana  $\delta$ -opioidnim receptorima. Ushodna regulacija ekspresije ovih receptora i oslobađanje endogenih opioida može povećati neuronalnu tolerancu na hipoksiju/ishemiju (Feng i sar., 2009). Opioidi mogu modulirati električnu aktivnost i ekscitatornu transmisiju baziranu na promenama aktivnosti jonskih kanala i jonskih flukseva (Fujita i sar., 2006). Aktivacija  $\delta$ -opioidnog receptora značajno smanjuje „curenje“  $K^+$  u uslovima hipoksije, što je karakteristično i za ishemiju (Sung i sar., 2008) delimično kroz inhibiciju punjenja  $Ca^{2+}$ . PKC-MEK-ERK signalizacija može biti glavni put za protekcije posredovane  $\delta$ -opioidnim receptorima. G protein aktivira PKC-ERK put i pojačava aktivnost Bcl-2 i suprimira oslobađanje citohroma c (Ma i sar., 2005).  $\delta$ -opioidni receptor povećava aktivnost glavnih enzima antioksidativne zaštite, glutation peroksidaze i SOD, i smanjuje nivo malonaldehida i NO u kori velikog mozga izloženoj moždanoj ishemiji/reperfuziji (Feng i sar., 2009).

Eksperimenti sa EMP različitih inteziteta i trajanja, su takođe pokazali da ova polja *per se* utiču na opioidni sistem dovodeći do hiperalgezije i analgezije (antinociceptivni efekat) kod eksperimentalnih životinja (Shupak i sar., 2004; Dixon i Persinger, 2001; Ryczko i Persinger, 2002; Bao i sar., 2006; Jeong i sar., 2006). Kada imamo na umu ove činjenice, moguće je da EMP imitira opioidne

transmitere ili ima uticaj na nivou opioidnih receptora i tako smanjuje hiperomotornu aktivnost izazvanu ishemijom (slika 36).

Takođe, ne možemo zanemariti učešće EMP u procesima koji leže u osnovi ishemijskog oštećenja ćelija i smrti. Neki od njih bi mogli uključivati „heat shock“ proteine (Hsp) s obzirom na uticaj koji EMP imaju na njihovu ekspresiju (Robertson i sar., 2007). Poznato je da povećana ekspresija Hsp obezbeđuje zaštitu u uslovima moždane ishemije, povećavajući broj preživelih neurona i tolerancu neurona na ishemijsku povredu (Welsh i sar., 1992; Yang i sar., 1999; Giffard i Yenari, 2004). Hsp štite proteine i citoskelet od oštećenja kroz mehanizme asocirane između ostalog sa poremećajem u masnim kiselinama dugog lanca i kalmodulina u stresnim situacijama kao što je ishemično oštećenje (Kregel, 2002). Tako, moguće je da EMP povećavajući ekspresiju Hsp ima neuroprotektivni efekat kod pustinjačkih miševa podvrgnutih globalnoj moždanoj ishemiji (Robertson i sar., 2007).

Neuroprotektivna efikasnost EMP u fokalnoj moždanoj ishemiji na modelu zeca i pacova je već pokazana (Grant i sar., 1994; Zhao i sar., 2003) i naši rezultati su u skladu sa ovim nalazima. Pa ipak, zanimljiv rezultat na osnovu našeg istraživanja je potpuno drugačiji efekat EMP u fiziološkim i patofiziološkim uslovima. U ovom istraživanju primenjeno EMP (0,5 mT, 50 Hz) koje samo po sebi indukuje porast spontane lokomotorne aktivnosti (Janać i sar., 2005, 2012), sprečava razvoj karakteristične hiperaktivnosti uzrokovane ishemijom, pokazujući mogućnost doprinosa patološkom oštećenju ali i neuroprotekciji istovremeno. Naši prethodni rezultati su takođe pokazali da EMP istih karakteristika smanjuje motornu hiperaktivnost izazvanu amfetaminom (1,5 mg/kg, i.p.) (Janać i sar., 2005). Svi ovi rezultati ukazuju na veoma kompleksnu prirodu EMP i navode na potrebu detaljnog istraživanja ovih efekata pod različitim okolnostima.

U našim istraživanjima je pokazano da je EMP faktor koji može jako brzo da deluje na parametre motorne aktivnosti i da svoje statistički značajno dejstvo ostvaruje već 1. i 2. dana nakon reperfuzije i pokazuje dalji trend smanjenja hiperlokomocije u ostalim vremenskim tačkama. I 7. dana nakon završenog tretmana ishemične životinje koje su bile u EMP pokazuju motornu aktivnost na nivou kontrolnih životinja.

Dobijene rezultate tj. činjenicu da EMP smanjuje motornu hiperaktivnost kod ishemičnih pustinjačkih miševa možemo povezati sa mogućnošću njegovog delovanja na sve pomenute nervne puteve i receptore a koji su uključeni tj. pogođeni ishemijskom povredom tako da ciljni neurotransmiteri preko kojih EMP može ostvariti svoje dejstvo mogu biti dopamin, serotonin, glutamat i acetilholin (Lai i Carino, 1999; Sieroń i sar., 2001; Shin i sar., 2007; Janać i sar., 2009; Manikonda i sar., 2007). Takođe, imajući u vidu značaj i sve puteve u koje je uključen  $Ca^{2+}$  kao i na osnovu poznatih rezultata o dejstvu EMP na ovaj jon (Manikonda i sar., 2007),  $Ca^{2+}$  bi mogao biti jedan od ključnih molekula u ovom putu a što bi opet direktno i/ili indirektno moduliralo sinaptičku transmisiju u bazalnim ganglijama. Na taj način bi se favorizovala sinaptička transmisija posredstvom GABAergičkih neurona indirektnog puta u bazalnim ganglijama što bi posledično dovelo do smanjenja motorne aktivnosti kao što se desilo u našem slučaju kada je EMP smanjilo ishemijom izazvanu hiperaktivnost. Takođe, primarno bi moglo da dođe do modulacije aktivnosti glutamatergičkih neurona kore velikog mozga koji se projektuju na bazalne ganglije. Takođe, uočeni efekti EMP na lokomociju ili kretanje i stereotipiju mogu se dovesti u vezu sa izmenjenom sinaptičkom transmisijom (prvenstveno dopaminergičkom) u nukleus akumbensu i strijatumu.

## **5.2. Uticaj EMP (0,5 mT, 50 Hz) na morfološke karakteristike mozga pustinjskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom**

Rezultati histoloških istraživanja ukazuju da ishemični pustinjski miševi izloženi EMP (0,5 mT, 50 Hz, 7 dana) imaju značajno smanjenu volumensku gustinu oštećenih neurona, kao i povećan odgovor astrocita i mikroglijalnih ćelija u hipokampusu.

Globalna moždana ishemija onemogućava normalnu sintezu ATP i funkciju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i dovodi do jonskog disbalansa, influksa vode i oticanja neurona (Murdoch i Hall, 1990). Ishemijska povreda je praćena inflamacijom čija posledica može biti edem mozga (Crack i Taylor, 2005). Određivanje volumena regiona mozga je koristan metod za procenu fizioloških i patoloških stanja kao što su starenje, razlike među polovima i Alchajmerova bolest (Sherrz i sar., 1996, von Bohlen i Halbach, 2002; Redwine i sar., 2003).

U ovoj studiji, procena volumena hipokampusa, zajedno sa merenjem podregiona (CA1, CA2, CA3 i DG) odvojeno, omogućava posmatranje gore pomenutih fenomena. Vrednosti volumena kontrolnih životinja su u skladu sa vrednostima koje su dobili i drugi istraživači na miševima (Sherrz i sar., 1996, von Bohlen i Halbach, 2002). Odsustvo promene ovog parametra u bilo kojoj eksperimentalnoj grupi, čak i kad se preračuna na pojedinačne subregione dovodi do zaključka da 10-min ishemijsko oštećenje nije dovoljno, u vremenskim tačkama kada je vršeno ovo merenje, da naruši KMB kao ni da izazove masovnu infiltraciju limfocita i/ili stepen degenerišućih ćelija koji bi ovom stereološkom metodom bio merljiv. Takođe, postoji mogućnost da infiltracija i degeneracija kompenzuju jedni druge tako da nema promene u volumenu.

Volumen striatuma je, takođe, nepromenjen kod svih eksperimentalnih grupa i kreće se od 22,88 - 23,71 mm<sup>3</sup> što je u okvirima volumena izmerenog kod 5 sojeva inbreed miševa (20-37 mm<sup>3</sup>) (Rosen i Williams, 2001).

Neuronska ćelijska smrt se javlja kao krajnja tačka poremećenog metaboličkog stanja i gubitka energije nakon moždane ishemije (Murdoch i Hall, 1990; Chen i Swanson, 2003). Postoje dva utvrđena puta apoptoze - mitohondrijalni unutrašnji put i spoljašnji put posredovan receptorima (Elmore, 2007). Unutrašnjim putem moždana ishemija dovodi do stvaranja propustljive tranzicione pore u unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani koja vodi ka razaranju spoljašnje mitohondrijalne membrane usled oslobađanja nekoliko apoptotskih faktora (kaspaze, endonukleaze, citohrom c, Kroemer i sar., 1998). Ovi događaji dovode do DNK fragmentacije. Put nezavisan od mitohondrija ili spoljašnji put apoptoze uključuje nekoliko familija receptora kao što su Fas. (Harukuni, 2006). Termin «odložena ćelijska smrt» (Kirino i sar., 1982, Corbet i Nurse, 1998) dobro opisuje vreme njenog pojavljivanja. Prvi znaci ćelijske smrti se javljaju nekoliko dana nakon ishemijskog oštećenja, dok progresija zavisi od trajanja i jačine ishemijskog događaja i poznata je kao fenomen sazrevanja (Martin i sar., 1998). Morfološki fenotip ekscitotoksične ćelijske smrti, koja se javlja nakon masivnog oslobađanja glutamata tokom ishemije postoji kao gradijent između dva osnovna oblika ćelijske smrti i bila je osnov novog koncepta apoptotično-nekrotičnog kontinuuma (Martin i sar., 1998). Naše generalno zapažanje, na osnovu NeuN-Dil-DAPI bojenja hipokampusa je selektivna osetljivost hipokampalnog CA1 regiona na ishemijsku povredu, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Sugawara i sar., 1999), DG je takođe oštećen ali u manjoj meri, potom sledi CA3 region i skoro neoštećen CA2 region. Najveća gustina oštećenih neurona (bojenje FJ) je uočena u grupi ishemičnih pustinjaških miševa 14. dana nakon reperfuzije i bila je uspešno blokirana izlaganjem EMP 14. dana nakon reperfuzije. Gustina degenerišućih

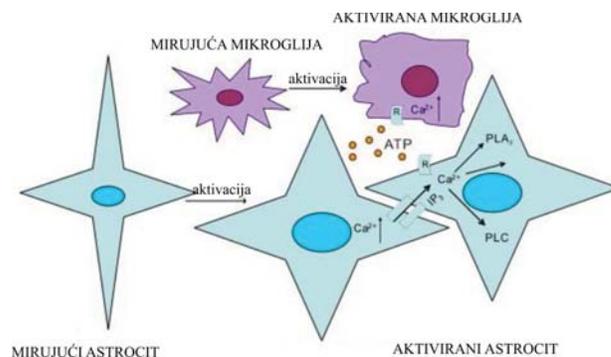
neurona u grupi ishemičnih pustinjskih miševa izloženih EMP je ostala na nivou grupe ishemičnih pustinjskih miševa 7. dana nakon reperfuzije.

FJ bojenje je jasno pokazalo selektivnu osetljivost moždanih struktura na ishemijsku povredu. Kod najvećeg broja životinja, nakon 10-min bilateralne okluzije, došlo je do jasno uočljive degeneracije u hipokampusu. Samo trećina životinja sa razvijenom ishemijom uočljivom u hipokampusu ima i oštećene neurone u striatumu i kori velikog mozga. FJ ćelije su uočljive u dorzolateralnim delovima striatuma (selektivna osetljivost u okviru strukture) i premotornom korteksu (insularnom korteksu i sekundarnom somatosenzornom korteksu) kore velikog mozga.

Neuroprotektivni efekat EMP je uočen i u drugim istraživanjima gde primenjeno EMP (različitog inteziteta i trajanja) pozitivno utiče na vijabilnost ćelija, povećava indeks proliferacije i čuva neurone od apoptoze *in vitro* (Oda i Koike, 2004; Di Loreto i sar, 2009; Pirozzoli i sar, 2003). Moguće je da kroz modifikaciju prometa glutamata u hipokampalnom tkivu (Wierazsko i sar., 2005) ili kroz smanjeno vezivanje za NMDA receptore (Manikonda i sar., 2007), EMP smanjuje ekscitotoksičnost i pomera neurone iz apoptoza-nekroza kontinuuma ka apoptotskom putu. Ovo bi dalje smanjilo u najvećoj mogućoj meri degeneraciju, inflamaciju i/ili indukovalo ekspresiju Hsp za koje je pokazano da imaju neuroprotektivan efekat u moždanoj ishemiji na nivou proteina i citoskeleta (Robertson i sar., 2007).

Moždana ishemija utiče na aktivaciju i proliferaciju glijalnih ćelija (Kato i sar., 2003; Panickar i Norenberg, 2005). Jedan od glavnih uzroka njihove aktivacije je snažno i povećano oslobađanje  $Ca^{2+}$  tokom ishemije (slika 36.). Odgovor astrocita tokom ishemije može biti kritičan za preživljavanje neurona i ishod ishemije, imajući u vidu njihovu funkciju u preuzimanju glutamata, transportu vode, odstranjivanju viška  $K^+$  i održavanju stalne pH vrednosti

(Chen i Swanson, 2003). Astroцити регулишу metabolizam u mozgu i predstavljaju glavno skladište glikogena (Swanson i Choi, 1993; Wender i sar., 2000).



**Slika 37.** Šematski prikaz  $\text{Ca}^{2+}$  talasa. ATP i  $\text{IP}_3$  učestvuju u propagaciji povećanog unutarćelijskog  $\text{Ca}^{2+}$ , koji će uticati na razne signalne puteve uključujući  $\text{PLA}_2$  i  $\text{PLC}$ . ATP - adenozin trifosfat;  $\text{IP}_3$  - inozitol trifosfat; R - receptor;  $\text{PLA}_2$  - fosfolipaza A2;  $\text{PLC}$  - fosfolipaza C. Preuzeto iz Liu (2011).

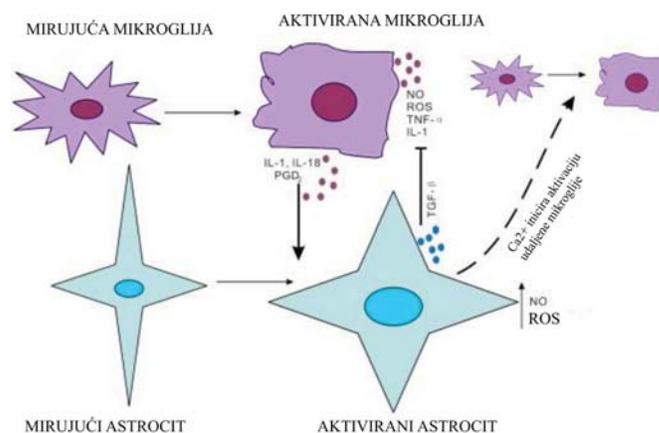
Pored toga, astroцити sadrže više koncentracije glutationa (Wilson, 1997), glavnog antioksidanta u mozgu i pokazuju veću mogućnost uklanjanja ROS nego neuroni. Antioksidativni kapacitet i komunikacija između neurona i astrocita je važna u odbrani od ROS. Astroglia je praćena hipertrofijom i proliferacijom astrocita kao odgovor na povredu mozga (Ridet i sar., 1997). Reaktivni astroцити povećavaju stepen ekspresije svojih strukturnih proteina kao što je GFAP koji su neophodni za normalnu funkciju fibroznih astrocita i astroglialne ćelije migriraju u udaljeni povređeni region i pridružuju se lokalnom skupu reaktivnih astrocita. Oni proizvode citokine uključujući  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{TNF-}\beta$ , interleukine (IL-1, IL-6, IL-10), interferone ( $\text{IFN-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\beta$ ) (Feuerstein i sar., 1998; Dong i Benveniste, 2001), ali takođe oslobađaju i NGF, FGF i cilijarni neurotrofički faktor (Ridet i sar., 1997). Naši rezultati su potvrdili postojanje reaktivnih astrocita nakon ishemijskog oštećenja što se vidi kroz morfologiju hipertrofiranih astrocita i povećanu ekspresiju GFAP. Zanimljiv je rezultat da primenjeno EMP snažno povećava odgovor astrocita kod ishemičnih pustinskih miševa, naročito 7. dana nakon reperfuzije (neposredan efekat

EMP). Prethodno je pokazano da akutno i hronično izlaganje sinusoidalnom, statičkom i kombinovanom EMP od 1 mT nema uticaja na citoskelet, proteine stresa i proliferaciju astrocita u kulturi (Bodega i sar., 2005), što je u skladu sa našim rezultatima u EMP grupi. Stimulacija proliferacije astrocita uočena kod ishemičnih životinja izloženih EMP nas dovodi do zaključka da su efekti magnetnih polja kompleksni i mogu biti različiti u fiziološkim i patofiziološkim stanjima. U našem slučaju, moguće je da primenjeno EMP dodatno stimuliše već povećanu sintezu astrocitnih proteina kod ishemičnih pustinskih miševa. Na taj način EMP doprinosi bržem i boljem prevazilaženju ishemijske povrede.

Mikroglialne ćelije kao «senzori patoloških događaja u mozgu» (Kreutzberg, 1996) su aktivirane u ishemijskom oštećenju. Kao imunokompetentne ćelije, koje nastaju od monocita iz krvi, mikroglialne ćelije deluju kao prva linija odbrane u mozgu. Još jedan od razloga zašto se mikroglia smatra imunoregulatornom ćelijom CNS je što produkuje imunoregulatorne citokine - IL-1, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  i TNF- $\alpha$  (Suzumura, 2002). Pošto mikroglia eksprimira receptore za većinu ovih citokina oni mogu funkcionisati kao autokrini regulatori. Čak i u stanju mirovanja mikroglialne ćelije su u velikoj meri aktivne i kontinuirano vrše nadgledanje lokalnog mikrokruženja. U odgovoru na povredu mozga, mikroglialne ćelije prolaze kroz promene u morfologiji, fenotipu i broju (Perry i Gordon, 1991). Mirujuće mikroglialne ćelije imaju kompaktno ćelijsko telo sa granatim nastavcima, dok aktivirane imaju veliko telo sa kratkim, debelim nastavcima (Jinno i sar., 2007). U patološkim stanjima, kao što je moždana ishemija, mikroglialne ćelije su spremne da fagocitiraju ćelijske ostatke nakon smrti ćelija. Takođe, mrtvi ili neuroni koji su u fazi umiranja se uklanjaju makrofagima nastalim od ramifikovane mikroglije. Promene elektriciteta nastale kao posledica nervnog oštećenja i promena u okružujućem jonskom miljeu oštećenih ćelija pokreću molekule i signale koji aktiviraju mikrogliju. Biološki aktivne supstance kao što

su peptidi i hormoni, su druga kategorija aktivatora. Faktori rasta ili citokini mogu takođe biti u stanju da aktiviraju mikroglialne ćelije, kao i neki molekuli koje oslobađaju neuroni i/ili astrociti. Aktivirana mikroglia proizvodi različite biološki aktivne supstance koje indukuju inflamaciju i ćelijsku smrt (ROS, NO, TNF- $\alpha$ , glutamat, histamin, eikozanoidi), ali takođe i one koji regulišu regenerativne procese kao što su neurotrofički molekuli koji uključuju NGF, BDNF, NT3, TGF- $\beta$ , IL-7, inhibitorni faktor leukemije (LIF), bFGF i IL-3 (Nakajima i Kohsaka, 2001). U našim eksperimentima mikroglialne ćelije su pokazale snažnu aktivaciju i ekspresiju kod ishemičnih pustinskih miševa, naročito izloženih EMP. EMP *per se* nije indukovalo bilo kakve promene u odgovoru mikroglialnih ćelija. Moguće je da EMP u izmenjenim stanjima, kao što je ishemijsko oštećenje pokazuje stimulatorni efekat na aktivaciju mikroglije usled promenjenog odgovora astrocita.

Postoji komplikovana interkomunikacija između aktivacije mikroglije i astrocita (slika 37.). Aktivirana mikroglia olakšava aktivaciju astrocita; aktivirani astrociti povratno regulišu mikroglialnu aktivnost i pokreću aktivaciju udaljene mikroglije. Ono što je veoma važno je da astrociti imaju dvostruku ulogu u CNS u inflamatornim bolestima, ne samo što imaju mogućnost da pojačaju imuni odgovor i ubrzaju oporavak, oni i ograničavaju inflamaciju u CNS i imaju neuroprotektivnu ulogu (inhibitoran efekat na aktiviranu mikrogliju). Postavlja se pitanje kako ova dva totalno suprotna efekta koegzistiraju. Step en inflamacije je veoma važan i u uslovima kada je inflamatorni stimulus suviše jak astrociti nisu u mogućnosti da inhibiraju produkciju NO u mikrogliji (von Bernhardt i Ramirez, 2001). Trajanje stimulusa je takođe relevantno za ishod astrocitnih efekata na modulaciju mikroglije.



**Slika 38.** Šematski prikaz interkomunikacije između mikroglije i astrocita. ATP - adenzin trifosfat; IL-1 - interleukin 1; IL-18 - interleukin 18; PGD<sub>2</sub> - prostaglandin D<sub>2</sub>; TGF- $\beta$  - transformišući faktor rasta  $\beta$ ; NO - azot oksid; ROS - reaktivne kiseonične vrste; TNF- $\alpha$  - faktor nekroze tumora  $\alpha$ . Preuzeto iz Liu (2011).

Povećan broj astrocita i mikroglije kod ishemičnih životinja izloženih EMP, naročito 7. dana nakon reperfuzije, bi mogao biti neuroprotektivan. Ova moguća zaštita je najuočljivija 14. dana nakon reperfuzije kada nivo degenerišućih neurona ostaje na onom kao i 7 dana nakon reperfuzije. Zaustavljanje dalje progresije postishemijskog oštećenja 14. Dana nakon reperfuzije, u uslovima izlaganja EMP, može ukazati na neuroprotektivnu ulogu astrocita (Li i sar., 2008) i mikroglije (Neuman i sar., 2006) u globalnoj moždanoj ishemiji. Tako, pozitivni efekti EMP bi mogli biti ostvareni kroz povećanu pokretljivost mikrovezikula u astrocitima (Golfert i sar., 2001), olakšavanje metaboličkih potreba oštećenih neurona ili povećanu ekspresiju BDNF i IL-1 $\beta$  signalnih puteva uključenih u preživljavanje (Di Loreto i sar., 2009).

Primenjeno EMP pokazuje sposobnost protekcije neurona u modelu globalne moždane ishemije kroz redukciju neuronalne smrti i aktivaciju astrocita i mikroglije.

### **5.3. Uticaj EMP (0,5 mT, 50 Hz) na parametre oksidativnog stresa u mozgu pustinjskih miševa sa eksperimentalno izazvanom globalnom moždanom ishemijom**

Rezultati naših istraživanja koji se odnose na parametre oksidativnog stresa pokazali su da: a) EMP povećava oksidativni stres u kori prednjeg mozga, striatumu i hipokampusu neposredno nakon završetka izlaganja, a izmerene vrednosti se vraćaju na kontrolne nivoe 7 dana nakon završetka izlaganja; b) globalna moždana ishemija dovodi do povećane produkcije parametara oksidativnog stresa u svim ispitivanim strukturama i 7. i 14. dana nakon reperfuzije; c) ishemični pustinjski miševi izlagani EMP imaju takođe povećane vrednosti parametara oksidativnog stresa, ali u znatno manjoj meri, 7. dana nakon reperfuzije, dok su 14. dana nakon reperfuzije vrednosti za izmerene parametre na nivou kontrolnih.

Produkcija slobodnih radikala, naročito reaktivnih kiseoničnih vrsta je zajednička karakteristika svih ćelija sa aerobnim metabolizmom. U fiziološkim koncentracijama, reaktivne kiseonične i azotne vrste imaju ulogu sekundarnih glasnika i molekula uključenih u unutarćelijsku signalnu kaskadu i odbranu od infektivnih vrsta (Dröge, 2002). Nizak nivo slobodnih radikala se održava kroz ravnotežu prooksidativnog i antioksidativnog sistema. Kada produkcija slobodnih radikala prevazilazi mogućnost njihovog uklanjanja, oni mogu imati razarajuće efekte i aktivirati puteve ćelijske smrti uključujući izmenjenu funkciju i patološka stanja. Oksidativna oštećenja enzima dovode do promene njihove aktivnosti, a strukturalna oštećenja proteina izazvana oksidativnim stresom stvaraju proteinske agregacije (Kregel i Zhang, 2007).

Moždana ishemija i reperfuzija dovode do povećanja oksidativnog stresa tj. stvaranja slobodnih radikala (Nita i sar., 2001; Selaković i sar., 2010, 2011) što za posledicu ima razarajuće efekte (Lewen i sar., 2000; Chan, 2001). Mozak,

usled visokog sadržaja lipida i relativno malog sadržaja endogenih antioksidanata, je organ posebno osetljiv na prisustvo slobodnih radikala (Sugawara i Chan, 2003). Stepem u kom će se stvarati slobodni radikali može da ima odlučujuću ulogu na celokupne fiziološke funkcije važne za preživljavanje. U uslovima moždane ishemije dolazi do prevelike aktivacije NMDA receptora što za posledicu ima povećanu produkciju ROS i NO. ROS dovodi do peroksidacije lipidnih membrana pri čemu se stvaraju toksični aldehidi kao što su 4-hidroksinonenal (4-HNE) koji oštećuje razne jonske kanale, transportere i citoskeletne proteine. Moždana ishemija dovodi do aktivacije fosfolipaze A2 (PLA2) koja oslobađa arahidonsku kiselinu iz membranskih fosfolipida a arahidonska kiselina je takođe značajan izvor ROS (Katsuki i Okuda, 1995). I reoksigencija tokom reperfuzije obezbeđuje supstrat za brojne enzimske reakcije oksidacije. Reperfuzija nakon ishemije dovodi do velike produkcije ROS u mitohondrijama koji troši endogene antioksidanate, a što dalje može dovesti do dramatičnog povećanja unutarćelijskog ROS.

Efekti izlaganja EMP na slobodnoradikalske vrste su ispitivni poslednjih godina i baziraju se na istraživanjama biofizičkih mehanizama kojim bi ova polja mogla uticati na koncentraciju slobodnih radikala (npr radical pair mechanism), kao i bioloških i biohemijskih mehanizama koji leže u osnovi izmenjenog stepena stvaranja radikala u izloženim ćelijama i/ili njihove povećane interakcije sa DNK. U slučaju da žive organizme posmatramo na nivou fizičkih procesa na atomskom nivou, a ne na nivou hemijskih reakcija između biomolekula (Adey, 1997), EMP bi moglo da reguliše stepen i količinu produkata biohemijske reakcije najverovatnije kroz mehanizam slobodnih radikala (McLauchlan i Steiner, 1991), između ostalog direktno utičući na aktivnost enzima (Grissom, 1995). Priroda hemijskih veze je u osnovi magnetna pošto su formirane između susednih atoma kroz sparivanje elektrona suprotnih spinova i na taj način privučene magnetnim silama. Po hipotezi Landera (1997)

određene aminokiseline proteina na površini ćelija se mogu ponašati kao selektivne mete za kiseonične i azotne slobodnoradikalske vrste i na taj način EMP podešava redoks potencijal molekula ciljnog proteina i utiče na interakcije tog proteina sa antitelima i hormonima.

EMP može aktivirati ćelije imunog sistema i slobodnoradikalske vrste (Frahm i sar., 2006, 2010; Lupke i sar., 2006). Zanimljivi su rezultati Di Loreto i sar. (2009) da EMP (50 Hz, 0,1 i 1 mT) samo blago povećavaju produkciju ROS i MDA (malondialdehid, parametar lipidne peroksidacije), ali značajno povećavaju ekspresiju BDNF i NGF u kulturi kortikalnih neurona. BDNF i NGF imaju ulogu u uklanjanju slobodnih radikala i zaštiti što ukazuje na mogućnost da EMP paralelno aktivira oksidanse i molekule sa osobinama antioksidanasa.

Studije koje se bave ispitivanjima efekata EMP na nocicepciju (Thomas i sar., 1997; Kavaliers i sar., 1998; Jeong i sar., 2006; Martin i Persinger, 2004), su pokazale da je  $Ca^{2+}$  uključen u ove procese i da dovodi do aktivacije NOS, enzima koji generiše NO. Takođe, u drugim eksperimentima, EMP (50 Hz, 100  $\mu$ T) povećava unutarćelijsku koncentraciju  $Ca^{2+}$ , kroz influks vanćelijskog  $Ca^{2+}$  i oslobađanja iz unutarćelijskih rezervi. Takođe EMP povećava provodljivost ćelijske membrane za  $Ca^{2+}$  (Huang i sar., 2000). U našim eksperimentima, EMP je povećalo produkciju NO u svim ispitivanim strukturama mozga pustinjskog miša neposredno nakon izlaganja. Yoshikawa i sar. (2000) su takođe našli da EMP (60 Hz, 0,1 mT) može da pojača stvaranje NO a do sličnih rezultata su došli i Jelenković i sar. (2006) nakon izlaganja EMP (50 Hz, 0,5 mT) u toku 7 dana. Coskun i sar. (2009) su nakon izlaganja EMP (50 Hz, 1,5 mT, 4h/day,) uočili povećanu produkciju NO, koja nije bila statistički značajna.

U našim eksperimentima, EMP je povećalo aktivnost SOD, jednog od glavnih enzima antioksidativne zaštite, a koji je dobar pokazatelj kapaciteta ćelije za uklanjanje superoksid radikala Ovi rezultati su u skladu sa nekim istraživanjima (Ciejka i sar.; Batcioglu i sar., 2002), ali takođe postoje i suprotni

rezultati. Tako su Falone i sar. (2007) pokazali smanjenje Cu,ZnSOD u kortikalnim ćelijama pacova nakon izlaganja EMP (50 Hz, 0,1 mT, 10 dana) i pozitivnu modulaciju antioksidativne zaštite ka više redukovanom stanju. Dodatno, Zwirinska-Korczala (2004) su opisali smanjenje Cu,ZnSOD i MnSOD sadržaja nakon izlaganja ćelijskih kultura EMP (185-195 Hz, 120 mT, 24 h i 48 h). Ovi različiti rezultati se mogu delimično objasniti različitim karakteristikama primenjenih polja, kao i različitim eksperimentalnim procedurama.

U većini istraživanja (bez obzira na trajanje i intezitet), kao i u našoj studiji, primenjeno polje povećava lipidnu peroksidaciju (Ciejka i sar., 2011; Jelenković i sar., 2006; Romodanova i sar., 1990; Bediz i sar., 2008), osim rezultata Coskun i sar. (2009) gde je kontinuirano i intermitentno MP (50 Hz, 1,5 mT, 4 h/dan, 4 dana) smanjilo lipidnu peroksidaciju u mozgu, ali je povećalo u plazmi i jetri. Međutim, primenjeno polje na modelu moždane ishemije pokazuje kapacitet da smanji ILP u toku izlaganja (7.dana) sa daljom redukcijom i smanjenjem na kontrolne vrednosti 14. dana tj. 7 dana nakon prestanka izlaganja. Na ovaj način EMP može da smanji štetne efekte moždane ishemije na membrane i redukuje dalju produkciju reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta. Jedno od mogućih objašnjenja je da kroz povećanje produkcije NO, a koje naši rezultati pokazuju, EMP redukuje ILP kod ishemičnih pustinskih miševa, pošto se zna da NO može direktno da inhibira lipidnu peroksidaciju reagujući sa intermedijernim molekulima kao što su alkoksil i peroksil radikali. Na taj način NO završava dalju propagaciju ove reakcije (Nicolescu i sar., 2002; Niziolek i sar., 2003).

Ne postoji uniformnost odgovora na primenjeno polje kao ni na ishemiju u smislu osetljivosti pojedinih stuktura kao i parametara oksidativnog stresa. Tako, recimo, što se tiče produkcije NO i O<sub>2</sub><sup>-</sup> kod životinja izloženih EMP 7. dana najveći stepen promene je uočljiv u kori prednjeg mozga dok je promena

približno ista u hipokampusu i striatumu. Stepenn promene lipidne peroksidacije i produkcije SOD je približno ujednačen u sve tri strukture u slučaju kada su životinje bile izložene EMP. Što se tiče odgovora praćenih parametara na moždanu ishemiju oni su ujednačeni u svim strukturama.

Ono što je siguran pokazatelj da EMP može da deluje kao antioksidans je što povećava produkciju SOD, jednog od enzima antioksidativne zaštite i na taj način sigurno i direktno i indirektno smanjuje količinu izuzetno reaktivnog O<sub>2</sub>.

Najznačajniji nalaz ove studije je da i pored toga što i EMP i ishemija zasebno povećavaju stepen oksidativnog stresa primenjeni istovremeno nemaju kumulativni efekat već dovode do smanjenja merenih parametara. Pošto se ne zna tačan vremenski profil očigledno zajedničkih puteva na koje deluju, teško je pretpostaviti trenutak i mesto na kome se aktivira ili dominira put kojim se aktiviraju enzimi antioksidativne zaštite. Za to su potrebna dodatna i biohemijska i molekularna istraživanja pri čemu treba uzeti u obzir sveukupnu interakciju svih gradivnih elemenata CNS.

Na osnovu iznetih rezultata iz naše studije, u toku samog izlaganja ishemičnih pustinskih miševa, EMP utiče na sve merene parametre ponašanja, oksidativnog stresa kao i histološka merenja u smislu smanjenja hiperaktivnosti, nivoa produkcije slobodnoradikalnih vrsta, ali i aktivacije astrocita i mikroglijalnih ćelija što bi predstavljalo njegov direktni efekat. Sedam dana nakon završenog izlaganja EMP, kada i sama ishemijska povreda ima svoju dinamiku, primenjeno polje održava većinu parametara na kontrolnom nivou i nastavlja da stimuliše proliferaciju astrocita i mikroglije tj. povećava njihovu aktivaciju, a što bi se moglo smatrati odloženim efektom EMP.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu iznetih rezultata možemo zaključiti da:

- ✓ kod ishemičnih životinja primenjeno EMP dovodi do smanjenja hipermotorne aktivnosti
- ✓ ishemični pustinjski miševi izloženi EMP 14. dana nakon reperfuzije pokazuju smanjen stepen umirućih neurona
- ✓ intezivna aktivacija astrocita je uočena u grupi ishemičnih pustinjskih miševa izloženih EMP 7. dana nakon reperfuzije (neposredno nakon prestanka izlaganja), dok su 14. dana nakon reperfuzije astrociti slični onima iz grupe ishemičnih životinja
- ✓ kod ishemičnih pustinjskih miševa, naročito onih izloženih EMP, dolazi do povećanja broja mikroglialnih ćelija po jedinici površine u poređenju sa kontrolom 7. dana nakon reperfuzije
- ✓ ishemični pustinjski miševi izloženi EMP imaju smanjene vrednosti merenih parametara oksidativnog stresa 7. dana nakon reperfuzije (neposredni efekat EMP), u poređenju sa jedinkama iz ishemične grupe ili grupe izložene EMP.

Kod ishemičnih pustinjskih miševa, primenjeno EMP inhibira razvoj karakteristične hipermotorne aktivnosti, smanjuje broj oštećenih neurona u hipokampusu, povećava ekspresiju astrocita i mikroglije i smanjuje stepen oksidativnog stresa u mozgu. Na osnovu analize ponašanja, biohemijskih i morfoloških karakteristika mozga, može se zaključiti da EMP (0,5 mT, 50 Hz) pokazuje neuroprotektivna svojstva u modelu globalne moždane ishemije kod pustinjskog miša.

Primenjeni eksperimentalni dizajn je pokazao da je kontinualni efekat EMP bio depresorni na ishemijom izazvano povećanje motorne aktivnosti,

antioksidativni i stimulatorni za astrocite i mikroglialne ćelije, i da se rezidualni efekat pokazao tj. zadržao na nivou merenih parametara oksidativnog stresa i glijalnih ćelija.

## 7. LITERATURA

**Adair RK.** A physical analysis of the ion parametric resonance model. *Bioelectromagnetics* 1998; 19:181-91.

**Adey R.** Jim Henry's world revisited--environmental "stress" at the psychophysiological and the molecular levels. *Acta Physiol Scand Suppl* 1997; 640:176-9.

**Adey WR.** Tissue interaction with noionizing electromagnetic fields. *Physiol Res* 1981; 61: 447-56.

**Akhand AA, Pu M, Senga T, Kato M, Suzuki H, Miyata T, Hamaguchi M, Nakashima I.** Nitric oxide controls src kinase activity through a sulfhydryl group modification-mediated Tyr-527-independent and Tyr-416-linked mechanism. *J Biol Chem* 1999; 274:25821-6.

**Akpolat V, Celik MS, Celik Y, Akdeniz N, Ozerdem MS.** Treatment of osteoporosis by long-term magnetic field with extremely low frequency in rats. *Gynecol Endocrinol* 2009; 25(8):524-9.

**Alexander GE, DeLong MR, Strick PL.** Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 1986; 9:357-81.

**Araki H, Yamamoto T, Futagami K, Karasawa Y, Hino N, Kawasaki H, Gomita Y.** Chronic methamphetamine administration inhibits cerebral ischemia-induced hyperactivity in Mongolian gerbils. *Physiol Behav* 2001; 74:127-31.

**Astrup J, Siesjö BK, Symon L.** Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981; 12:723-5.

**Bachevalier J, Meunier M.** Cerebral ischemia: are the memory deficits associated with hippocampal cell loss? *Hippocampus* 1996; 6:553-60.

**Balassa T, Szemerszky R, Bárdos G.** Effect of short-term 50 Hz electromagnetic field exposure on the behavior of rats. *Acta Physiol Hung* 2009; 96:437-48.

**Bao X, Shi Y, Huo X, Song T.** A possible involvement of beta-endorphin, substance P, and serotonin in rat analgesia induced by extremely low frequency magnetic field. *Bioelectromagnetics* 2006; 27:467-72.

**Bast T, Feldon J.** Hippocampal modulation of sensorimotor processes. *Prog Neurobiol* 2003; 70:319-45.

**Bawin SM, Adey WR.** Sensitivity of calcium binding in cerebral tissue to weak environmental electric fields oscillating at low frequency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73:1999-2003.

**Bawin SM, Kaczmarek LK, Adey WR.** Effects of modulated VHF fields on the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 1975; 247:74-81.

**Bawin SM, Satmary WM, Adey WR.** Nitric oxide modulates rhythmic slow activity in rat hippocampal slices. *Neuroreport* 1994; 5:1869-72.

**Beckman JS.** Ischaemic injury mediator. *Nature*. 1990; 345(6270):27-8.

**Beetsch JW, Park TS, Dugan LL, Shah AR, Gidday JM.** Xanthine oxidase-derived superoxide causes reoxygenation injury of ischemic cerebral endothelial cells. *Brain Res* 1998; 786:89-95

**Birch PJ, Rogers H, Hayes AG, Hayward NJ, Tyers MB, Scopes DI, Naylor A, Judd DB.** Neuroprotective actions of GR89696, a highly potent and selective kappa-opioid receptor agonist. *Br J Pharmacol* 1991; 103:1819-23.

**Bishop GA, Chang HT, Kitai ST.** Morphological and physiological properties of neostriatal neurons: an intracellular horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience* 1982; 7:179-91.

**Blackman CF, Benane SG, House DE, Joines WT.** Effects of ELF (1-120 Hz) and modulated (50 Hz) RF fields on the efflux of calcium ions from brain tissue in vitro. *Bioelectromagnetics* 1985; 6:1-11.

**Blackwell RP.** Effects of extremely-low-frequency electric fields on neuronal activity in rat brain. *Bioelectromagnetics* 1986; 7:425-34.

**Blanchard JP, Blackman CF.** Clarification and application of an ion parametric resonance model for magnetic field interactions with biological systems. *Bioelectromagnetics* 1994; 15:217-38.

**Block F, Schwarz M.** Dextromethorphan reduces functional deficits and neuronal damage after global ischemia in rats. *Brain Res* 1996; 741:153-9.

**Block F.** Global ischemia and behavioural deficits. *Prog Neurobiol* 1999; 58:279-95.

**Bodega G, Forcada I, Suárez I, Fernández B.** Acute and chronic effects of exposure to a 1-mT magnetic field on the cytoskeleton, stress proteins, and proliferation of astroglial cells in culture. *Environ Res* 2005; 98: 355-62.

**Bokura H, Robinson RG.** Long-term cognitive impairment associated with caudate stroke. *Stroke* 1997; 28:970-5.

**Bolam JP, Wainer BH, Smith AD.** Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience* 1984; 12:711-8.

**Brådvik B, Sonesson B, Holtås S.** Spatial impairment following right hemisphere transient ischaemic attacks in patients without carotid artery stenosis. *Acta Neurol Scand* 1989; 80:411-8.

**Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtsberg FW, Mattson MP.** Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 1996; 2:788-94.

**Budd SL.** Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. *Pharmacol Ther* 1998; 80:203-29.

**Byus CV, Pieper SE, Adey WR.** The effects of low-energy 60-Hz environmental electromagnetic fields upon the growth-related enzyme ornithine decarboxylase. *Carcinogenesis* 1987; 8:1385-9.

**Cagnacci A, Elliott JA, Yen SS.** Melatonin: a major regulator of the circadian rhythm of core temperature in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 75(2):447-52.

**Campagne MV, Thibodeaux H, van Bruggen N, Cairns B, Lowe DG.** Increased binding activity at an antioxidant-responsive element in the metallothionein-1 promoter and rapid induction of metallothionein-1 and -2 in response to cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurosci* 2000; 20:5200-7.

**Caplan L.** Caplan's stroke. A clinical approach. Butterworth Heinemann. 2000.

**Carney JM, Floyd RA.** Protection against oxidative damage to CNS by alpha-phenyl-tert-butyl nitron (PBN) and other spin-trapping agents: a novel series of nonlipid free radical scavengers. *J Mol Neurosci* 1991; 3:47-57.

**Chan PH.** Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. . *J Cereb Blood Flow Metab* 2001 Jan; 21(1):2-14.

**Chen Y, Swanson R.** Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23:137-49.

**Choi D.** Antagonizing excitotoxicity: a therapeutic strategy for stroke? *Mt Sinai J Med* 1998; 65:133-8.

**Corbett D, Evans SJ, Nurse SM.** Impaired acquisition of the Morris water maze following global ischemic damage in the gerbil. *Neuroreport* 1992; 3:204-6.

**Corbett D, Nurse S.** The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog Neurobiol* 1998; 54:531-48.

**Crack PJ, Taylor JM.** Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 1433-44.

**De Witte L, Verhoeven J, Engelborghs S, De Deyn PP, Mariën P.** Crossed aphasia and visuo-spatial neglect following a right thalamic stroke: a case study and review of the literature. *Behav Neurol* 2008; 19:177-94.

**Dekanski D, Selaković V, Piperski V, Radulović Z, Korenić A, Radenović L.** Protective effect of olive leaf extract on hippocampal injury induced by transient global cerebral ischemia and reperfusion in Mongolian gerbils. *Phytomedicine* 2011; 18(13):1137-43.

**Delgado JM, Leal J, Monteagudo JL, Gracia MG.** Embryological changes induced by weak, extremely low frequency electromagnetic fields. *J Anat* 1982; 134:533-51.

**Denes A, Thornton P, Rothwell NJ, Allan SM.** Inflammation and brain injury: acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. *Brain Behav Immun* 2010; 24:708-23.

**Deno DW, Carpenter DO.** Sources and characteristic of electric and magnetic fields in the environment. 1994. In: Carpenter DO and Ayrapetyan S (Eds), *Biological effects of electric and magnetic fields* (pp.3-51). Academic Press, San Diego,CA.

**Di Loreto S, Falone S, Caracciolo V, Sebastiani P, D'Alessandro A, Mirabilio A, Zimmitti V, Amicarelli F.** Fifty hertz extremely low-frequency magnetic field exposure elicits redox and trophic response in rat-cortical neurons. *J Cell Physiol* 2009; 219:334-43.

**Dixon SJ, Persinger MA.** Suppression of analgesia in rats induced by morphine or L-NAME but not both drugs by microTesla, frequency-modulated magnetic fields. *Int J Neurosci* 2001; 108:87-97.

**Dong Y, Benveniste EN.** Immune function of astrocytes. *Glia* 2000; 36:180-90.

**Dowman R, Wolpaw JR, Seegal RF, Satya-Murti S.** Chronic exposure of primates to 60-Hz electric and magnetic fields: III. Neurophysiologic effects. *Bioelectromagnetics* 1989; 10:303-17.

**Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP.** Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 2008; 55:310-8.

**Dragašević N, Potrebić A, Damjanović A, Stefanova E, Kostić VS.** Therapeutic efficacy of bilateral prefrontal slow repetitive transcranial magnetic stimulation in

depressed patients with Parkinson's disease: an open study. *Mov Disord* 2002; 17(3):528-32.

**Dröge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82:47-95.

**Edvinsson L, Krause DN.** Cerebral blood flow and metabolism. Lippincott Williams and Wilkins 2002.

**Emsley HC, Smith CJ, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, Hallenbeck JM, del Zoppo GJ, Rothwell NJ, Tyrrell PJ, Hopkins SJ.** An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis. *J Neuroimmunol* 2003; 139(1-2):93-101.

**Feuerstein G, Wang X, Barone FC.** Cytokines in brain ischemia--the role of TNF alpha. *Cell Mol Neurobiol* 1998; 18:695-701

**Fridovich I.** Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:97-112.

**Fukuda S, Kondo T, Takebayashi H, Taga T.** Negative regulatory effect of an oligodendrocytic bHLH factor OLIG2 on the astrocytic differentiation pathway. *Cell Death Differ* 2004; 11:196-202.

**Gavalas RJ, Walter DO, Hamer J, Adey WR.** Effect of low-level, low-frequency electric fields on EEG and behavior in *Macaca nemestrina*. *Brain Res* 1970; 18:491-501.

**George MS, Wassermann EM, Kimbrell TA, Little JT, Williams WE, Danielson AL, Greenberg BD, Hallett M, Post RM.** Mood improvement following daily left prefrontal repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with depression: a placebo-controlled crossover trial. *Am J Psychiatry*. 1997; 154(12):1752-6.

**Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr, Sibley DR.** D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 1990; 250:1429-32.

**Gerschenson LE, Rotello RJ.** Apoptosis: A different type of cell death. *FASEB J* 1992; 6:2450-5.

**Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, Chan PH, Park TS.** Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289:H558-68.

**Giffard RG, Swanson RA.** Ischemia-induced programmed cell death in astrocytes. *Glia* 2005; 50:299-306.

**Giffard RG, Yenari MA.** Many mechanisms for hsp70 protection from cerebral ischemia. *J Neurosurg Anesthesiol* 2004; 16:53-61.

**Godefroy O, Rousseaux M, Pruvo JP, Cabaret M, Leys D.** Neuropsychological changes related to unilateral lenticulostriate infarcts. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57:480-5.

**Gölfert F, Hofer A, Thümmeler M, Bauer H, Funk RH.** Extremely low frequency electromagnetic fields and heat shock can increase microvesicle motility in astrocytes. *Bioelectromagnetics* 2001; 22:71-8.

**Gonzalez CL, Gharbawie OA, Kolb B.** Chronic low-dose administration of nicotine facilitates recovery and synaptic change after focal ischemia in rats. *Neuropharmacology* 2006; 50:777-87.

**Gow AJ, McClelland M, Garner SE, Malcolm S, Ischiropoulos H.** The determination of nitrotyrosine residues in proteins. *Methods Mol Biol* 1998; 100:291-9.

**Graham SH, Chen J.** Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21:99-109.

**Graham SH, Shimizu H, Newman A, Weinstein P, Faden AI.** Opioid receptor antagonist nalmefene stereospecifically inhibits glutamate release during global cerebral ischemia. *Brain Res* 1993; 632:346-50.

**Grant G, Cadossi R, Steinberg G.** Protection against focal cerebral ischemia following exposure to a pulsed electromagnetic field. *Bioelectromagnetics* 1994; 15:205-16.

**Grassi C, D'Ascenzo M, Torsello A, Martinotti G, Wolf F, Cittadini A, Azzena GB.** Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. *Cell Calcium* 2004; 35:307-15.

**Groenewegen HJ.** The basal ganglia and motor control. *Neural Plast* 2003; 10:107-20.

**Guevara I, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Gołabek I, Bartuś S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A.** Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta* 1998; 274(2):177-88.

**Gulyás AI, Tóth K, McBain CJ, Freund TF.** Stratum radiatum giant cells: a type of principal cell in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 1998; 10:3813-22.

**Gulyás AI, Tóth K, McBain CJ, Freund TF.** Stratum radiatum giant cells: a type of principal cell in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 1998; 10(12):3813-22.

**Gundersen HJG, Jensen EB.** The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; 147: 229-63.

**Gundersen HJG.** Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc* 1986; 3-45.

**Halliwell B, Gutteridge JM.** The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 1995; 18:125-6.

**Han HS, Yenari MA.** Cellular targets of brain inflammation in stroke. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 4:522-9.

**Harukuni I, Bhardwaj A.** Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol Clin* 2006; 24:1-21.

**Héron A, Traiffort E, Allix M, Dimitriadou V, Schwartz JC.** Prodynorphin mRNA expression in the rat dentate gyrus after cerebral ischemia. *Neuropeptides* 1996; 30:355-8.

**Hikosaka O, Takikawa Y, Kawagoe R.** Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiol Rev* 2000; 80:953-78.

**Hill SM, Blask DE.** Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res* 1988; 48:6121-6.

**Höflich G, Kasper S, Möller HJ.** Successful treatment of seasonal compulsive syndrome with phototherapy. *Nervenarzt* 1992; 63(11):701-4.

**Hoover JE, Strick PL.** The organization of cerebellar and basal ganglia outputs to primary motor cortex as revealed by retrograde transneuronal transport of herpes simplex virus type 1. *J Neurosci* 1999; 19:1446-63.

**Hossmann KA.** Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology* 2008; 55:257-70.

**Hossmann KA.** Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovasc Res* 1998; 39:106-20.

**Hsu CY.** Ischemic stroke: from basic mechanisms to new drug development. Karger 1998.

**Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ.** Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* 2006 Sep; 66(3):232-45.

**Hurn PD, Vannucci SJ, Hagberg H.** Adult or perinatal brain injury: does sex matter? *Stroke* 2005; 36:193-5.

**Imai F, Suzuki H, Oda J, Ninomiya T, Ono K, Sano H, Sawada M.** Neuroprotective effect of exogenous microglia in global brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27:488-500.

**Janać B.** Uticaj promenljivog magnetnog polja na motorno ponašanje pacova u laboratorijskim uslovima, str. 1-83, 2007. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.

**Janać B, Pešić V, Jelenković A, Vorobyov V, Prolić Z.** Different effects of chronic exposure to ELF magnetic field on spontaneous and amphetamine-induced locomotor and stereotypic activities in rats. *Brain Res Bull* 2005; 67:498-503.

**Janać B, Radenović L, Selaković V, Prolić Z.** Time course of motor behavior changes in Mongolian gerbils submitted to different durations of cerebral ischemia. *Behav Brain Res* 2006; 175:362-73.

**Janać B, Tovilović G, Tomić M, Prolić Z, Radenović L.** Effect of continuous exposure to alternating magnetic field (50 Hz, 0.5 mT) on serotonin and dopamine receptors activity in rat brain. *Gen Physiol Biophys* 2009; 28:41-6.

**Jelenković A, Janać B, Pešić V, Jovanović MD, Vasiljević I, Prolić Z.** The effects of exposure to extremely low-frequency magnetic field and amphetamine on the reduced glutathione in the brain. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1048:377-80.

**Jelenković A, Janać B, Pešić V, Jovanović DM, Vasiljević I, Prolić Z.** Effects of extremely low-frequency magnetic field in the brain of rats. *Brain Res Bull* 2006; 68:355-60.

**Jeong JH, Kum C, Choi HJ, Park ES, Sohn UD.** Extremely low frequency magnetic field induces hyperalgesia in mice modulated by nitric oxide synthesis. *Life Sci* 2006; 78:1407-12.

**Jinno S, Fleischer F, Eckel S, Schmidt V, Kosaka T.** Spatial arrangement of microglia in the mouse hippocampus: a stereological study in comparison with astrocytes. *Glia* 2007; 55: 1334-47.

**Johnson MT, Waite LR, Nindl G.** Noninvasive treatment of inflammation using electromagnetic fields: current and emerging therapeutic potential. *Biomed Sci Instrum* 2004; 40:469-74.

**Juutilainen J, Harri M, Saali K, Lahtinen T.** Effects of 100-Hz magnetic fields with various waveforms on the development of chick embryos. *Radiat Environ Biophys* 1986; 25:65-74.

**Kaszuba-Zwoińska J, Ciećko-Michalska I, Madroszkiewicz D, Mach T, Słodowska-Hajduk Z, Rokita E, Zaraska W, Thor P.** Magnetic field anti-inflammatory effects in Crohn's disease depends upon viability and cytokine profile of the immune competent cells. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59: 177-87.

**Kato H, Takahashi A, Itoyama Y.** Cell cycle protein expression in proliferating microglia and astrocytes following transient global cerebral ischemia in the rat. *Brain Res Bull* 2003; 60:215-21.

**Katsuki H, Okuda S.** Arachidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance. *Prog Neurobiol* 1995; 46:607-36.

**Kavaliers M, Choleris E, Prato FS, Ossenkopp K.** Evidence for the involvement of nitric oxide and nitric oxide synthase in the modulation of opioid-induced antinociception and the inhibitory effects of exposure to 60-Hz magnetic fields in the land snail. *Brain Res* 1998; 809:50-7.

**Kavaliers M, Ossenkopp KP, Hirst M.** Magnetic fields abolish the enhanced nocturnal analgesic response to morphine in mice. *Physiol Behav* 1984; 32:261-4.

**Kavaliers M, Ossenkopp KP, Prato FS, Innes DG, Galea LA, Kinsella DM, Perrot-Sinal TS.** Spatial learning in deer mice: sex differences and the effects of endogenous opioids and 60 Hz magnetic fields. *J Comp Physiol A* 1996; 179:715-24.

**Kavaliers M, Ossenkopp KP, Tysdale DM.** Evidence for the involvement of protein kinase C in the modulation of morphine-induced 'analgesia' and the inhibitory effects of exposure to 60-Hz magnetic fields in the snail, *Cepaea nemoralis*. *Brain Res* 1991; 554:65-71.

**Kavaliers M, Ossenkopp KP.** Calcium channel involvement in magnetic field inhibition of morphine-induced analgesia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1987; 336:308-15.

**Kavaliers M, Ossenkopp KP.** Repeated naloxone treatments and exposures to weak 60-Hz magnetic fields have 'analgesic' effects in snails. *Brain Res* 1993; 620:159-62.

**Kemp JM, Powell TP.** The cortico-striate projection in the monkey. *Brain* 1970; 93:525-46.

**Kety SS, Schmidt CF.** The nitrous oxide method for the quantitative determination of cerebral blood flow in man; theory, procedure and normal values. *J Clin Invest* 1948; 27(4):476-83.

**Kim SU i de Vellis J.** Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 2005; 81:302-13.

- Kinoshameg SA, Persinger MA.** Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in rats by 50-nT, 7-Hz amplitude-modulated nocturnal magnetic fields depends on when after inoculation the fields are applied. *Neurosci Lett* 2004; 370:166-70.
- Kirino T, Sano K.** Changes in the contralateral dentate gyrus in Mongolian gerbils subjected to unilateral cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* 1980; 50:121-9.
- Kirino T.** Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 1982; 239:57-69.
- Kita H, Kitai ST.** Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in rat neostriatum: their morphological types and populations. *Brain Res* 1988; 447:346-52.
- Kitai ST, Deniau JM.** Cortical inputs to the subthalamus: intracellular analysis. *Brain Res* 1981; 214:411-5.
- Kitai ST.** Anatomy and physiology of the neostriatum. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1981; 30:1-21.
- Kochanek PM, Hallenbeck JM.** Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke* 1992; 23:1367-79.
- Kolodynski AA, Kolodynska VV.** Motor and psychological functions of school children living in the area of the Skrunda Radio Location Station in Latvia. *Sci Total Environ* 1996; 180:87-93.
- Kregel KC.** Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 2002; 92:2177-86.
- Kreutzberg GW.** Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996; 19:312-8.
- Krnjević K, Xu YZ, Zhang L.** Anoxic block of GABAergic IPSPs. *Neurochem Res* 1991; 16:279-84.
- Krnjević K.** Electrophysiology of cerebral ischemia. *Neuropharmacology* 2008; 55:319-33.
- Kuroiwa T, Bonnekoh P, Hossmann KA.** Locomotor hyperactivity and hippocampal CA1 injury after transient forebrain ischemia of gerbils. *Neurosci Lett* 1991; 122:141-4.
- Lacy-Hulbert A, Metcalfe JC, Hesketh R.** Biological responses to electromagnetic fields. *FASEB J* 1998; 12:395-420.

**Lai H, Carino M.** 60 Hz magnetic fields and central cholinergic activity: effects of exposure intensity and duration. *Bioelectromagnetics* 1999; 20:284-9.

**Lai H, Carino MA, Horita A, Guy AW.** Effects of a 60 Hz magnetic field on central cholinergic systems of the rat. *Bioelectromagnetics* 1993; 14:5-15.

**Lai H, Carino MA, Ushijima I.** Acute exposure to a 60 Hz magnetic field affects rats' water-maze performance. *Bioelectromagnetics* 1998; 19:117-22.

**Lai H.** Spatial learning deficit in the rat after exposure to a 60 Hz magnetic field. *Bioelectromagnetics* 1996; 17:494-6.

**Lander HM.** An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB* 1997; 11:118-24.

**Larsson E, Lindvall O, Kokaia Z.** Stereological assessment of vulnerability of immunocytochemically identified striatal and hippocampal neurons after global cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2001; 913:117-32.

**Lawson LJ, Perry VH, Gordon S.** Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1992; 48:405-15.

**Lednev VV.** Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems. *Bioelectromagnetics* 1991; 12:71-5.

**Lee B, Johng H, Lim J, Jeong J, Baik K, Nam T, Lee J, Kim J, Sohn U, Yoon G, Shin S, Soh K.** Effects of extremely low frequency magnetic field on the antioxidant defense system in mouse brain: a chemiluminescence study. *J Photochem Photobiol B* 2004; 73: 43-8.

**Lerchl A, Nonaka KO, Stokkan KA, Reiter RJ.** Marked rapid alterations in nocturnal pineal serotonin metabolism in mice and rats exposed to weak intermittent magnetic fields. *Biochem Biophys Res Communications* 1990; 169:102-8.

**Lewén A, Matz P, Chan PH.** Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma* 2000; 17:871-90.

**Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, Pardo AC, Nodin C, Ståhlberg A, Aprico K, Larsson K, Yabe T, Moons L, Fotheringham A, Davies I, Carmeliet P, Schwartz JP, Pekna M, Kubista M, Blomstrand F, Maragakis N, Nilsson M, Pekny M.** Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28: 468-81.

**Liburdy RP, Sloma TR, Sokolic R, Yaswen P.** ELF magnetic fields, breast cancer, and melatonin: 60 Hz fields block melatonin's oncostatic action on ER+ breast cancer cell proliferation. *J Pineal Res* 1993; 14:89-97.

- Litovitz TA, Montrose CJ, Wang W.** Dose-response implications of the transient nature of electromagnetic-field-induced bioeffects: theoretical hypotheses and predictions. *Bioelectromagnetics* 1992; 1:237-46.
- Liu XH, Kato H, Nakata N, Kogure K, Kato K.** An immunohistochemical study of copper/zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in rat hippocampus after transient cerebral ischemia. *Brain Res* 1993; 625:29-37.
- Liu W, Tang Y, Feng J.** Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sci* 2011; 89(5-6):141-6.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-75.
- Luben RA, Cain CD, Chen MC, Rosen DM, Adey WR.** Effects of electromagnetic stimuli on bone and bone cells in vitro: inhibition of responses to parathyroid hormone by low-energy low-frequency fields. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79:4180-4.
- Machado LS, Kozak A, Ergul A, Hess DC, Borlongan CV, Fagan SC.** Delayed minocycline inhibits ischemia-activated matrix metalloproteinases 2 and 9 after experimental stroke. *BMC Neurosci* 2006; 7:56.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C.** Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:323-50.
- Manikonda PK, Rajendra P, Devendranath D, Gunasekaran B, Channakeshava, Aradhya RS, Sashidhar RB, Subramanyam C.** Influence of extremely low frequency magnetic fields on Ca<sup>2+</sup> signaling and NMDA receptor functions in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 2007; 413:145-9.
- Margonato V, Nicolini P, Conti R, Zecca L, Veicsteinas A, Cerretelli P.** Biologic effects of prolonged exposure to ELF electromagnetic fields in rats: II. 50 Hz magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 1995; 16:343-55.
- Mark KS, Davis TP.** Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282(4):H1485-94.
- Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C.** Neurodegeneration in excitotoxicity, global ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 1998; 46:281-309.
- McGeer P, McGeer E.** Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008; 23: 474-83.

**McGivern RF, Sokol RZ, Adey WR.** Prenatal exposure to a low-frequency electromagnetic field demasculinizes adult scent marking behavior and increases accessory sex organ weights in rats. *Teratology* 1990; 41:1-8.

**McKay BE, Persinger MA.** Application timing of complex magnetic fields delineates windows of posttraining-pretesting vulnerability for spatial and motivational behaviors in rats. *Int J Neurosci* 2000; 103:69-77.

**McLaughlin S.** The electrostatics properties of membranes. *Annu Rev Biophys Chem* 1989; 18:113-36.

**Mehta SL, Manhas N, Raghbir R.** Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev* 2007; 54:34-66.

**Messick JM, Milde LN.** Brain Protection. *Advances in Anesthesiology* 1987; 4:47-88.

**Mori T, Tateishi N, Kagamiishi Y, Shimoda T, Satoh S, Ono S, Katsube N, Asano T.** Attenuation of a delayed increase in the extracellular glutamate level in the peri-infarct area following focal cerebral ischemia by a novel agent ONO-2506. *Neurochem Int* 2004; 45:381-7.

**Murdoch J, Hall R.** Brain protection: physiological and pharmacological considerations. Part I: The physiology of brain injury. *Can J Anaesth* 1990; 37:663-71.

**Nakajima K, Kohsaka S.** Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J Biochem* 2001; 130:169-75.

**Nambu A, Kaneda K, Tokuno H, Takada M.** Organization of corticostriatal motor inputs in monkey putamen. *J Neurophysiol* 2002; 88:1830-42.

**Namura S, Iihara K, Takami S, Nagata I, Kikuchi H, Matsushita K, Moskowitz MA, Bonventre JV, Alessandrini A.** Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:11569-74.

**Neumann J, Gunzer M, Gutzeit HO, Ullrich O, Reymann KG, Dinkel. K.** Microglia provide neuroprotection after ischemia. *FASEB J* 2006; 20:714-6.

**Nikolić LM, Rokić MB, Todorović NV, Kartelija GS, Nedeljković MS, Zakrzewska JS.** Effect of alternating the magnetic field on phosphate metabolism in the nervous system of *Helix pomatia*. *Biol Res* 2010; 43:243-50.

**Nindl G, Balcavage WX, Vesper DN, Swez JA, Wetzel BJ, Chamberlain JK, Fox MT.** Experiments showing that electromagnetic fields can be used to treat inflammatory diseases. *Biomed Sci Instrum* 2000; 36:7-13.

- Nishino T, Tamura I.** The mechanism of conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase and the role of enzyme in reperfusion injury. *Adv Exp Med Biol* 1991; 309A:327-33.
- Nita DA, Nita V, Spulber S, Moldovan M, Popa DP, Zagrean AM, Zagrean L.** Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion - a biochemical study in rat. *J Cell Mol Med* 2001; 5:163-70.
- Oda T, Koike T.** Magnetic field exposure saves rat cerebellar granule neurons from apoptosis in vitro. *Neurosci Lett* 2004; 365:83-6.
- Panickar KS, Norenberg MD.** Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. *Glia* 2005; 50:287-98.
- Paxinos G, Franklin K.** The Mouse brain in stereotaxic coordinates. Elsevier Academic Press, USA, 2004.
- Perry VH, Gordon S.** Macrophages and the nervous system. *Int Rev Cytol* 1991; 125:203-44.
- Peskine A, Picq C, Pradat-Diehl P.** Cerebral anoxia and disability. *Brain Inj* 2004; 18:1243-54.
- Pirozzoli MC, Marino C, Lovisolo GA, Laconi C, Mosiello L, Negroni A.** Effects of 50 Hz electromagnetic field exposure on apoptosis and differentiation in a neuroblastoma cell line *Bioelectromagnetics* 2003; 24:510-6.
- Post A, Keck ME.** Transcranial magnetic stimulation as a therapeutic tool in psychiatry: what do we know about the neurobiological mechanisms? *J Psychiatr Res* 2001; 35(4):193-215.
- Prato FS, Carson JJ, Ossenkopp KP, Kavaliers M.** Possible mechanisms by which extremely low frequency magnetic fields affect opioid function. *FASEB J* 1995; 9(9):807-14.
- Privat A, Chauvet N, Gimenez y Ribotta M.** Neuronal regeneration and the glial barrier. *Rev Neurol (Paris)* 1997; 153:515-20.
- Prolić Z, Janać B, Pešić V, Jelenković A.** The effect of extremely low-frequency magnetic field on motor activity of rats in the open field. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1048:381-4.
- Pulsinelli WA, Levy DE, Duffy TE.** Cerebral blood flow in the four-vessel occlusion rat model. *Stroke* 1983; 14:832-4.

**Rauš S, Selaković V, Radenović L, Prolić Z, Janać B.** Extremely low frequency magnetic field induced changes in motor behaviour of gerbils submitted to global cerebral ischemia. *Behav Brain Res* 2012; 228:241-6.

**Redwine JM, Kosofsky B, Jacobs RE, Games D, Reilly JF, Morrison JH, Young WG, Bloom FE.** Dentate gyrus volume is reduced before onset of plaque formation in PDAPP mice: a magnetic resonance microscopy and stereologic analysis. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100:1381-6.

**Rehncrona S.** Biochemical factors influencing recovery in brain ischemia. *Acta Neurol Scand Suppl* 1980; 78:167-74.

**Rempel-Clower NL, Zola SM, Squire LR, Amaral DG.** Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *J Neurosci* 1996; 16:5233-55.

**Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH.** Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 1997; 20:570-7.

**Robertson JA, Thomas AW, Bureau Y, Prato FS.** The influence of extremely low frequency magnetic fields on cytoprotection and repair. *Bioelectromagnetics* 2007; 28:16-30.

**Rollwitz J, Lupke M, Simkó M.** Fifty-hertz magnetic fields induce free radical formation in mouse bone marrow-derived promonocytes and macrophages. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1674:231-8.

**Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell CJ, Roger V, Rumsfeld J, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Hong Y.** Heart disease and stroke statistics-2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee *Circulation* 2007;1 15:e69-171.

**Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabín J, Fernández-Cadenas I, Ribó M, Molina CA, Lo EH, Montaner J.** Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke* 2006; 37:1399-406.

**Rudolph K, Wirtz-Justice A, Krauchli K, Feer H.** Static magnetic fields decrease nocturnal pineal cAMP in the rat. *Brain Res* 1998; 446:159-60.

**Ryczko MC, Persinger MA.** Increased analgesia to thermal stimuli in rats after brief exposures to complex pulsed 1 microTesla magnetic fields. *Percept Mot Skills* 2002; 95:592-8.

**Saito A, Tominaga T, Chan PH.** Neuroprotective role of neurotrophins: relationship between nerve growth factor and apoptotic cell survival pathway after cerebral ischemia. *Curr Atheroscler Rep* 2005; 7(4):268-73.

**Šekeljić V, Bataveljić D, Stamenković S, Ułamek M, Jabłoński M, Radenović L, Pluta R, Andjus PR.** Cellular markers of neuroinflammation and neurogenesis after ischemic brain injury in the long-term survival rat model. *Brain Struct Funct* 2012; 217(2):411-20.

**Selaković V, Korenić A, Radenović L.** Spatial and temporal patterns of oxidative stress in the brain of gerbils submitted to different duration of global cerebral ischemia. *Int J Dev Neurosci* 2011; 29(6):645-54.

**Selaković V, Janać B, Radenović L.** MK-801 effect on regional cerebral oxidative stress rate induced by different duration of global ischemia in gerbils. *Mol Cell Biochem* 2010; 342:35-50.

**Selaković V, Raičević R, Radenović L.** Temporal patterns of soluble adhesion molecules in cerebrospinal fluid and plasma in patients with the acute brain infraction. *Dis Markers* 2009; 26:65-74.

**Selaković V, Raičević R, Radenović L.** The increase of neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and plasma as a marker of neuronal damage in patients with acute brain infarction. *J Clin Neurosci* 2005; 12:542-7.

**Sherry DF, Galef Jr B, Clark MM.** Sex and intrauterine position influence the size of the gerbil hippocampus. *Physiol Behav* 2006; 60:1491-4.

**Shin EJ, Jeong JH, Kim HJ, Jang CG, Yamada K, Nabeshima T, Kim HC.** Exposure to extremely low frequency magnetic fields enhances locomotor activity via activation of dopamine D1-like receptors in mice. *J Pharmacol Sci* 2007; 105:367-71.

**Shupak NM, Hensel JM, Cross-Mellor SK, Kavaliers M, Prato FS, Thomas AW.** Analgesic and behavioral effects of a 100 microT specific pulsed extremely low frequency magnetic field on control and morphine treated CF-1 mice. *Neurosci Lett* 2004; 354:30-3.

**Sienkiewicz ZJ, Haylock RG, Saunders RD.** Deficits in spatial learning after exposure of mice to a 50 Hz magnetic field. *Bioelectromagnetics* 1998; 19(2):79-84.

**Sieroń A, Brus R, Szkilnik R, Plech A, Kubański N, Cieślak G.** Influence of alternating low frequency magnetic fields on reactivity of central dopamine receptors in neonatal 6-hydroxydopamine treated rats. *Bioelectromagnetics* 2001; 22:479-86.

**Sies H.** Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; 215:213-9.

- Siesjö BK.** Cerebral circulation and metabolism. *J Neurosurg* 1984; 60:883-908.
- Simkó M, Droste S, Kriehuber R, Weiss DG.** Stimulation of phagocytosis and free radical production in murine macrophages by 50 Hz electromagnetic fields. *Eur J Cell Biol* 2001; 80:562-6.
- Simkó M, Mattsson MO.** Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses in vitro: possible immune cell activation. *J Cell Biochem* 2004; 93:83-92.
- Smith Y, Raju DV, Pare JF, Sidibe M.** The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends Neurosci* 2004; 27:520-7.
- Sobel E, Davanipour Z, Sulkava R, Erkinjuntti T, Wikstrom J, Henderson VW, Buckwalterm G, Bowman JD, Lee PJ.** Occupations with exposure to electromagnetic fields: a possible risk factor for Alzheimer's disease. *Am J Epidemiol* 1995; 142:515-24.
- Spitz DR, Oberley LW.** An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem* 1989; 179(1):8-18.
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J.** Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992; 258:1898-902.
- Stoll G, Jander S, Schroeter M.** Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* 1998; 56(2):149-71.
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW.** Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1988; 1:301-7.
- Sugawara T, Chan PH.** Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5:597-607.
- Sugawara T, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, Chan PH.** Mitochondrial release of cytochrome c corresponds to the selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons in rats after transient global cerebral ischemia. *J Neurosci* 1999; 19:RC39.
- Swanson RA, Choi DW.** Glial glycogen stores affect neuronal survival during glucose deprivation in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993; 13:162-9.
- Takakusaki K, Habaguchi T, Ohtinata-Sugimoto J, Saitoh K, Sakamoto T.** Basal ganglia efferents to the brainstem centers controlling postural muscle tone and locomotion: a new concept for understanding motor disorders in basal ganglia dysfunction. *Neuroscience* 2003; 119:293-308.
- Tang AH.** Protection from cerebral ischemia by U-50,488E, a specific kappa opioid analgesic agent. *Life Sci* 1985; 37:1475-82.

**Tang XC, Rao MR, Hu G, Wang H.** Alterations of amino acid levels from striatum, hippocampus, and cerebral cortex induced by global cerebral ischemia in gerbil. *Acta Pharmacol Sin* 2000; 21:819-23.

**Terman GW, Drake CT, Simmons ML, Milner TA, Chavkin C.** Opioid modulation of recurrent excitation in the hippocampal dentate gyrus. *J Neurosci* 2000; 20:4379-88.

**Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS, Ossenkopp KP.** Pulsed magnetic field induced "analgesia" in the land snail, *Cepaea nemoralis*, and the effects of mu, delta, and kappa opioid receptor agonists/antagonists. *Peptides* 1997; 18(5):703-9.

**Thorvaldsen P, Kuulasmaa K, Rajakangas AM, Rastenyte D, Sarti C, Wilhelmsen L.** Stroke trends in the WHO MONICA project. *Stroke* 1997; 28:500-6.

**Tower DB, Young OM.** The activities of butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase, the rate of anaerobic glycolysis, and the question of a constant density of glial cells in cerebral cortices of various mammalian species from mouse to whale. *J Neurochem* 1973; 20:269-78.

**Ubeda A, Leal J, Trillo MA, Jimenez MA, Delgado JM.** Pulse shape of magnetic fields influences chick embryogenesis. *J Anat* 1983; 137:513-36.

**Vallbona C, Hazlewood CF, Jurida G.** Response of pain to static magnetic fields in postpolio patients: a double-blind pilot study. *Arch Phys Med Rehabil* 1997; 78(11):1200-3.

**van der Knaap MS, Valk J.** Magnetic resonance of myelination and myelin disorders, 3rd ed. Berlin: Springer; 2005.

**Vasquez BJ, Anderson LE, Lowery CI, Adey WR.** Diurnal patterns in brain biogenic amines of rats exposed to 60-Hz electric fields. *Bioelectromagnetics* 1988; 9:229-36.

**Ventura C, Spurgeon H, Lakatta EG, Guarnieri C, Capogrossi MC.** Kappa and delta opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and Ca<sup>2+</sup> release from an intracellular pool in myocytes and neurons. *Circ Res* 1992; 70:66-81.

**von Bohlen und Halbach O, Unsicker K.** Morphological alterations in the amygdala and hippocampus of mice during ageing. *Eur J Neurosci* 2002; 16:2434-40.

**Walz W, Hertz L.** Comparison between fluxes of potassium and of chloride in astrocytes in primary cultures. *Brain Res* 1983; 277:321-8.

**Walz W.** Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter. *Glia* 2000; 31:95-103.

- Wang D, Corbett D.** Cerebral ischemia, locomotor activity and spatial mapping. *Brain Res* 1990; 533:78-82.
- Warner MA, Neill KH, Nadler JV, Crain BJ.** Regionally selective effects of NMDA receptor antagonists against ischemic brain damage in the gerbil. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991; 11:600-10.
- Warner DS, Sheng H, Batinic-Haberle I.** Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 2004; 207: 3221-31.
- Welsh FA, Moyer DJ, Harris VA.** Regional expression of heat shock protein-70 mRNA and c-fos mRNA following focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992; 12:204-12.
- Wen YD, Zhang HL, Qin ZH.** Inflammatory mechanism in ischemic neuronal injury. *Neurosci Bull* 2006; 22:171-82.
- Wender R, Brown A, Fern R, Swanson R, Farrell K, Ransom B.** Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *J Neurosci* 2000; 20: 6804-10.
- Wertheimer N, Leeper E.** Re: "Acute Nonlymphocytic Leukemia and Residential Exposure to Power-Frequency Magnetic Fields". *Am J Epidemiol* 1989; 130:423-7.
- Wiard RP, Dickerson MC, Beek O, Norton R, Cooper BR.** Neuroprotective properties of the novel antiepileptic lamotrigine in a gerbil model of global cerebral ischemia. *Stroke* 1995; 26:466-72.
- Wieraszko A, Armani J, Maqsood N, Raja H, Philip S.** Modification of the synaptic glutamate turnover in the hippocampal tissue exposed to low-frequency, pulsed magnetic fields. *Brain Res* 2005; 1052:232-5.
- Wilson CJ, Groves PM.** Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 1980; 194:599-615.
- Wilson JX.** Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75:1149-63.
- Witter MP, Amaral DG.** Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J Comp Neurol.* 1991; 307(3):437-59.
- Yamamoto T, Araki H, Futagami K, Kawasaki H, Gomita Y.** Dopaminergic neurotransmission triggers ischemia-induced hyperactivity in Mongolian gerbils. *Acta Med Okayama* 2001; 55:277-82.

**Yang CR, Mogenson GJ.** An electrophysiological study of the neural projections from the hippocampus to the ventral pallidum and the subpallidal areas by way of the nucleus accumbens. *Neuroscience* 1985; 15:1015-24.

**Yang YL, Lin MT.** Heat shock protein expression protects against cerebral ischemia and monoamine overload in rat heatstroke. *Am J Physiol* 1999; 276:H1961-7.

**Zecca L, Ferrario P, Margonato V, Cerretelli P, Zonta N.** Neurotransmitter amino acid variations in striatum of rats exposed to 50 Hz electric fields. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1075:1-5.

**Zecca L, Mantegazza C, Margonato V, Cerretelli P, Caniatti M, Piva F, Dondi D, Hagino N.** Biological effects of prolonged exposure to ELF electromagnetic fields in rats: III. 50 Hz electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 1998; 19:57-66.

**Zhang XY, Xue Y, Zhang Y.** Effects of 0.4 T rotating magnetic field exposure on density, strength, calcium and metabolism of rat thigh bones. *Bioelectromagnetics* 2006; 27(1):1-9.

**Zhao L, Zhao DM, Wei JH, Wang YQ, Huang ZM.** Effect of extremely low frequency magnetic field on the focal brain injury in rats. *Space Med Med Eng (Beijing)* 2003; 16:75-6.

**Zheng Z, Lee JE, Yenari MA.** Stroke: molecular mechanisms and potential targets for treatment. *Curr Mol Med* 2003; 3:361-72.

**Zola-Morgan S, Squire LR.** Memory impairment in monkeys following lesions limited to the hippocampus. *Behav Neurosci* 1986; 100:155-60.

## BIOGRAFIJA

Snežana Rauš rođena je 10.05.1980. godine u Rumi, gde je završila osnovnu i srednju školu. Godine 1999. je upisala Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Opšta biologija. Studije je završila 2007. godine, sa srednjom ocenom 8,51. Godine 2007. je upisala doktorske studije na Biološkom fakultetu, smer Neuronauke, modul Neurobiologija sa neuroimunologijom. Od 01.04.2008. godine je zaposlena kao stručni saradnik, a od 01.09.2008. godine kao istraživač pripravnik u Odeljenju za neurofiziologiju, Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković". Od 17.09.2009. godine zaposlena je kao istraživač saradnik. Član je Društva za neuronauke Srbije i Srpskog društva za mikroskopiju.

Svoj naučno-istraživački rad dipl. biolog Snežana Rauš je realizovala kroz projekte finansirane od strane Ministarstva za nauku Republike Srbije: "Uticaj magnetnih polja kao ekofiziološkog faktora na različite biološke sisteme i moguća primena u biomedicini" (projekat 143027, 2008-2010) i "Uticaj magnetnih polja i drugih sredinskih stresora na fiziološke odgovore i ponašanje različitih vrsta" (projekat OI173027, 2011-).

Autor je i koautor više naučnih radova:

- **Rauš S**, Selaković V, Manojlović-Stojanoski M, Radenović L, Prolić Z, Janać B. Response of Hippocampal Neurons and Glial Cells to Alternating Magnetic Field in Gerbils Submitted to Global Cerebral Ischemia. *Neurotox Res.* 2012 DOI: 10.1007/s12640-012-9333-8. IF=3.514; M22
- Janać B, Selaković V, **Rauš S**, Radenović L, Zrnić M, Prolić Z. (2012) Temporal patterns of extremely low frequency magnetic field-induced motor behavior changes in Mongolian gerbils of

different age. Int J Radiat Biol. 88(4):359-66.  
IF=1.861; M21 ♦**Rauš S**, Selaković V, Radenović L, Prolić Z, Janać  
B. (2012) Extremely low frequency magnetic field induced changes  
in motor behaviour of gerbils submitted to global cerebral  
ischemia. Behav Brain Res. 228(2):241-6.  
IF=3.393; M21

♦radovi publikovani na osnovu rezultata iz ove doktorske disertacije