

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Ljiljana D. Martać

**SPEKTRALNA ANALIZA
ELEKTROKORTIKALNE AKTIVNOSTI
MOZGA PACOVA U MODELU
INTOKSIKACIJE ALUMINIJUMOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Ljiljana D. Martać

**SPECTRAL ANALYSIS OF
ELECTROCORTICAL BRAIN ACTIVITY IN
RAT MODEL OF ALUMINIUM
INTOXICATION**

PhD thesis

Belgrade, 2013

Mentori:

dr.Lidija Radenović, redovni profesor Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

dr Slađana Spasić, viši naučni saradnik Instituta za multidisciplinarna istraživanja,
Univerziteta u Beogradu

Komisija za ocenu i javnu odbranu disertacije:

dr Lidija Radenović, redovni profesor Biološkog fakulteta, , Univerziteta u Beogradu

dr Slađana Spasić, viši naučni saradnik Instituta za multidisciplinarna istraživanja, ,
Univerziteta u Beogradu

dr Pavle Andjus, redovni profesor Biološkog fakulteta, , Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: 2013.

SPEKTRALNA ANALIZA ELEKTROKORTIKALNE AKTIVNOSTI MOZGA PACOVA U MODELU INTOKSIKACIJE ALUMINIJUMOM

Rezime

Cilj ove teze je prikaz metoda za kvalitativnu i kvantitativnu analizu moždane aktivnosti. Ujedno je matematički urađena biomedicinska aproksimacija rezultata. Animalni model intoksikacije aluminijumom je korišćen zbog rasprostranjenosti aluminijuma u prirodi i okruženju. Aluminijum ima selektivno neurotoksično dejstvo na pojedine delove mozga. Ujedno neurotoksičnost aluminijuma ima za posledicu izmenjenu aktivnost celog mozga, ali i specifično dejstvo na pojedine moždane funkcije. Animalni model nudi mogućnost više parametara i može se koristiti za izučavanje neurotoksičnosti aluminijuma pod različitim okolnostima. Procesi koji prate neurotoksičnost mogu se porediti sa promenama koje se javljaju u akutnim i hroničnim stanjima bolesti.

Spektralna analiza zasnovana na Furijerovoj transformaciji daje opis promena elektrokortikalne aktivnosti po frekventnim oblastima. Poređenje spektara snage i njihova statistička analiza omogućavaju kvantifikaciju promena. Praćena je elektrokortikalna aktivnost parijetalnog korteksa i malog mozga kako bi se obuhvatila sva tri parametra intoksikacije: akumulacija u tkivu, lokalno izmenjena aktivnost neurona i promena regulatorne funkcije - plastičnost i adaptabilnost mozga. Eksperimentalni dizajn podrazumeva variranje parametara intoksikacije (aplikacija aluminijuma, moždana struktura, doza, starost, soj, fiziološko stanje). Na osnovu dobijenih podataka definisani su efekti neurotoksičnosti aluminijuma. Varijabilnost parametara fizioloških promena i efekata neurotoksičnosti su matematički analizirani. Rezultati ukazuju da promena moždane aktivnosti može biti graduisana tako da može poslužiti kao dijagnostičko-prognostički parametar patofiziološkog stanja.

Ova studija ima multidisciplinarni značaj jer obrađuje različite aspekte - biološki, fiziološki i medicinski.

Ključne reči: neurotoksičnost, elektrofiziologija, spektralna analiza

Naučna oblast: Neuronauke

Uža naučna oblast: neurofiziologija sa biofizikom

UDK broj:[591.181:616-099] : [517.443+519.23] (043.3)

SPECTRAL ANALYSIS OF ELECTROCORTICAL BRAIN ACTIVITY IN RAT MODEL OF ALUMINIUM INTOXICATION

Summary

The aim of the study was quantitative and qualitative analysis of electrocortical brain activity in rat model of aluminium intoxication. We used animal model of aluminium intoxication because aluminium toxicity is widespread in nature. Aluminium has selective effects on different brain regions. Animal model included different variables, so it can be used to study neurotoxicity in different conditions. Also, processes due to neurotoxicity can be compared with state of some acute or chronic diseases.

Spectral analysis was based on Fast Fourier Transform and changes of electrocortical activity was observed in relation to frequency ranges. Comparison of power spectra and statistic analyses was used for quantification of changes in brain activity. We recorded electrocortical activity of parietal cortex and cerebellum to include all parameters of intoxication: accumulation in tissue, changes of neuronal local group activity and changes in regulatory function - plasticity and adaptability of brain. Experimental procedure included different parameters of intoxication - application of aluminium, brain structure, doses, age, strain and physiological state of animals. Based on obtained data we define effects of neurotoxicity. Biological parameters, such as neurotoxic effects, physiological change and intoxication are mathematically analyzed. Results suggest that the change of brain activity can be used in diagnoses and prognoses of pathophysiological state.

This study presents synthesis of biological, physiological and medical aspect.

Key words: neurotoxicity, electrophysiology, spectral analysis

Scientific field: Neuroscience

Narrower scientific field: neurophysiology and biophysics

UDK number: [591.181:616-099] : [517.443+519.23] (043.3)

SADRŽAJ

-Naslov doktorske disertacije-srpski.....	
-Naslov doktorske disertacije-engleski.....	
-Podaci o mentoru i članovima komisije.....	
-Rezime-srpski.....	
-Rezime-engleski.....	
1. Uvod.....	1
2. Elektrofiziološke osnove moždane aktivnosti pod dejstvom aluminijuma	3
2.1. Električna aktivnost mozga – osnovni pojmovi	3
2.2. Principi elektrokortikografije	5
2.2.1. Osnovne osobine EEG-a i ECoG-a.....	5
2.2.2. Analiza EEG-a i ECoG-a.....	5
2.3. Posebnosti i razlike u električnoj aktivnosti velikog i malog mozga.....	8
2.4. Neurotoksičnost aluminijuma.....	9
2.5. Animalni model neurotoksičnosti.....	11
2.6. Linearne i nelinearne metode u analizi električne moždane aktivnosti...	13
3. Cilj.....	16
4. Materijali i metode.....	17
4.1. Eksperimentalne životinje i animalni model.....	17
4.1.1. Eksperimentalna procedura davanja aluminijuma i doziranje....	18

4.2. Eksperimentalni protokol i operativna procedura.....	19
4.3. Registrovanje električne moždane aktivnosti i akvizicija ECoG signala..	19
4.4. Spektri snage u analizi ECoG-a.....	20
4.5. Fraktalna dimenzija u analizi ECoG-a.....	21
4.6. Statistička analiza.....	22
5. Rezultati.....	24
5.1. Spektralna analiza električne aktivnosti velikog i malog mozga pacova u kontrolnim uslovima i posle tretiranja aluminijumom - prikaz po frekventnim opsezima.....	25
5.2. Fraktalna analiza električne aktivnosti velikog i malog mozga pacova u kontrolnim uslovima i posle tretiranja aluminijumom.....	31
5.3. Dozni efekat tretmana aluminijumom na ECoG aktivnost.....	35
5.4. Sekundarni efekat kod mladunaca izloženih aluminijumu u gestacionom i laktacionom periodu.....	40
5.5. Spontana aktivnost malog mozga i njegova uloga u neurotoksičnosti.....	43
6. Diskusija.....	45
7. Zaključak.....	55
Literatura.....	56
Biografija autora.....	69

1.UVOD

Aluminijum je jedan od najrasprostranjenijih metala u prirodi i može dospeti u organizam putem vode, hrane ili lekova. Izlaganje organizma aluminijumu u zavisnosti od doze ima toksičan efekat kako na ljude tako i na životinja. Toksičnost aluminijuma se zasniva na njegovoj interakciji sa brojnim ćelijskim procesima u organizmu. Sa obzirom da je aluminijum jedan od uzročnika različitih obolenja ljudi, njegovo dejstvo i mehanizmi toksičnosti su predmet intenzivnih proučavanja u poslednje dve decenije. Toksičnost aluminijuma i dozna tolerancija su dobro proučeni, ali molekularni mehanizmi toksičnosti su još uvek ne razjašnjeni te su predmet mnogobrojnih istraživanja..

Neurotoksičnost aluminijuma je potvrđena u brojnim studijama (Jope & Johnson, 1992; Meiri H., 1993). Aluminijum interaguje sa procesima u ćeliji izazivajući fizičke promene na ćelijskoj membrani, interagujući sa funkcijom voltažno-zavisnih jonskih kanala i sekrecijom neurotransmitera. Aluminijum utiče na procese u jedru, citoplazmi i mitohondrijama i to delujući na metabolizam glukoze, signalnu transdukciju, otpuštanje neurotransmitera, fosforilaciju i defosforilaciju proteina, aksonalni transport neurofilamenata (Walton J.M., 1998). Nakupljanje aluminijuma u nervnom tkivu može biti uzrok inflamacije mozga (Campbell A., 2004). Interesantno je da aluminijum izaziva različite neurobiheviornalne promene u razviću koje se razlikuju od onih kod odraslih jedinki. Studije pokazuju da oralno uzet aluminijum u periodu razvića ima veliku toksičnost i izaziva promene u razviću mozga kako životinja tako i ljudi (Bishop N.M., 1997; Yumoto H., 2000; Colomina M.T., 2005).

Brojni eksperimentalni i literaturni podaci ukazuju da aluminijum kao neurotoksin izaziva neurodegenerativna obolenja kao što su Alchajmerova demencija, dializna demencija ili Parkinsonova bolest (Yokel R. A., 2000). Istraživanja na animalnim modelima pokazala su da izlaganje aluminijumu ima za posledicu promene ponašanja, kognitivnih procesa kao i učenja i pamćenja (Woodruff-Pak D. S., 2007). Promene izazvane aluminijumom kod jedinki u embrionalnom razviću, periodu laktacije ili gestacije su drugačije u odnosu na zrele jedinke i zavise od doze i trajanja intoksikacije (Golub M.

S., 1999). U visokim dozama aluminijum može da dovede do malformativnih promena u embrionalnom razviću miševa sa poremećajima skeletnog sistema, nervnog sistema i unutrašnjih organa - jetra, srce, pluća (Colomina M.T., 1994). U uslovima narušene homeostaze aluminijum se selektivno nakuplja u tkivima. Početak nakupljanja aluminijuma je vezan za narušavanje homeostaze Ca^{2+} i kao posledica toga javlja se poremećena bubrežna funkcija. Najosetljivije je nervno tkivo što za posledicu ima promenu jonske homeostaze usled intoksikacijom narušene funkcije jonskih kanala krvno moždane barijere.

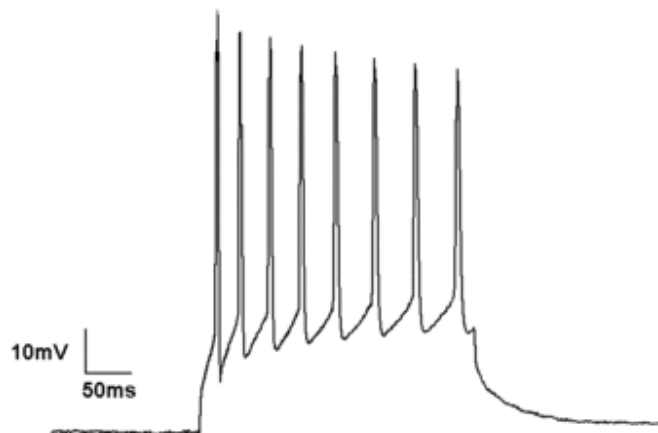
U ovoj doktorskoj disertaciji korišćeno je više tehnika i metoda za analizu patofizioloških funkcija mozga pomoću animalnog modela neurotoksičnosti pacova koji pruža mogućnost izučavanja bioloških patofizioloških fenomena u *in vivo* i kasnije u *in vitro* uslovima. Analizom elektrokortikalne moždane aktivnosti uz pomoć matematičkih i statističkih metoda mogu da se opišu promene izazvane intoksikacijom aluminijumom na animalnom modelu pacova. U fiziološkim i patofiziološkim uslovima, na eksperimentalnim modelima, posmatrani su mehanizmi adaptabilnosti, plastičnosti i akumulacija aluminijuma u nervnom tkivu mozga pacova. Animalni modeli pacova korišćeni u eksperimentima opisuju promene neuronske aktivnosti mozga pacova u različitim režimima intoksikacije aluminijumom i pogodni su za procenu akutne i hronične intoksikacije. Naša elektrofiziološka i histopatološka ispitivanja su potvrdila da aluminijum ima neurotoksičan efekat kako kod odraslih pacova tako i kod mladunaca izloženih aluminijumu u toku gestacije i laktacije.

2. ELEKTROFIZIOLOŠKE OSNOVE MOŽDANE AKTIVNOSTI POD DEJSTVOM ALUMINIJUMA

Ova studija predstavlja kvalitativnu i kvantitativnu analizu elektrokortikalne aktivnosti mozga pacova u uslovima intoksikacije aluminijumom. Animalni model toksičnosti aluminijuma korišćen je u elektrofiziološkim eksperimentima (Martac Lj., 2006). Registrovana je aktivnost grupe neurona u kontrolnim uslovima i kod intoksiniranih jedinki. Neurotoksičnost aluminijuma ima selektivno dejstvo i pogađa kako ceo mozak tako i pojedine strukture i funkcije mozga. U osnovi promene aktivnosti mozga pacova tretiranih aluminijumom je razlika u nakupljanju aluminijuma u pojedinim delovima mozga, promena jonske homeostaze i neurotransmitterske aktivnosti. Kao sekundarni efekat neurotoksičnosti javlja se citotoksičnost i neurodegeneracija. Kvalitativni opis promene aktivnosti neurona registrovane elektrokortikografski (EcoG) sa površine moždane kore pruža spektralna analiza. Promene u pojedinim frekventnim oblastima su opisane i testirane statistički. Kvantitativna analiza je vršena izračunavanjem fraktalne dimenzije.

2.1. Električna aktivnost mozga - osnovni pojmovi

Ćelije kore velikog mozga se odlikuju prisustvom fluktuirajućeg membranskog potencijala koje prostornom i vremenskom sumacijom daju ekstracelularni potencijal odgovarajuće amplitude (revijski prikazano u Kandel i sar., 2000). Registracija aktivnosti mozga može se vršiti uz pomoć intracelularnih elektroda koje beleže aktivnost pojedinačnog neurona ili ekstracelularnim elektrodama koje registruju aktivnost većeg broja ćelija. Aktivnost ovih neurona može se registrovati elektrokortikografski (ECoG, sa površine moždane kore) ili elektroencefalografski (EEG, sa površine lobanje).



Slika 1. Elektrofiziološki zapis akcionih potencijala

Postojanje električnog potencijala u mozgu prvi je opisao engleski hirurg Caton 1875. godine. Značajan doprinos dao je psihijatar Berger koji je 1929. objavio rad o ritmičnoj aktivnosti potencijala mozgaljudi. Počev od 1930. kada je usavršena merna aparatura, EEG je našao primenu u kliničkoj praksi (Willis i Grossman, 1977).

EEG signal je složen kontinuiran zapis moždane aktivnosti u vremenu (Slika 1). On predstavlja skup tzv. potencijala polja registrovanih pomoću elektroda postavljenih na površini glave. Elektrode se pri tome postavljaju u paru prema utvrđenoj šemi i ovaj postupak se zove montaža. EEG je zapis sumarne aktivnosti većeg broja neurona, međutim sve ćelije ne doprinose u istoj meri veličini amplitude. EEG predominantno reflektuje aktivnost piramidalnih neurona u blizini elektrode. Takođe u odnosu na ECoG amplituda je manja što se objašnjava atenuacijom usled prisustva i drugih neekscitabilnih ćelija i tkiva.

Karakteristike EEG i ECoG signala tj. oblik talasa, amplituda i trajanje se ne mogu predvideti, pa se signal posmatra kao stohastički proces. Kao takvi, EEG i ECoG signali zahtevaju matematičku analizu. Bez nje tumačenje EEG i ECoG signala je krajnje subjektivno i ne vodi logičnoj sistematizaciji. Moguće je statistički odrediti neke parametre kao što su prosečna amplituda i prosečna frekvencija. Takođe, moguće je uočiti dominantnu frekvenciju ili sličnost između EEG (ECoG) zapisa registrovanih istovremeno sa leve i desne hemisfere ili sa iste strukture u različitim uslovima. Prvo zapažanje u analizi EEG-a i

ECoG je da li je taj zapis drugačiji u odnosu na kontrolu. Drugi korak bi bila kvantifikacija promena i na kraju uočavanje izvesnih trendova u toku dužeg registrovanja.

2.2. Principi elektrokortikografije

2.2.1. Osnovne osobine EEG-a i ECoG-a

Definisane frekventne oblasti su u korelaciji sa fiziološkom, a kod ljudi mentalnom aktivnošću ispitanika. To su: α , β , δ , θ i γ ritam. Delta (δ) i teta (θ) ritam su kod odraslih u vezi sa fazama spavanja. U praksi je najniža frekvencija određena dužinom FFT epohe, a najčešće se uzima vrednost od 0,5 Hz. Delta ritam obuhvata frekventno područje od 0-4 Hz, a teta ritam oblast od 4-8 Hz. Delta ritam preovlađuje kod pacova u budnom stanju mirovanja, a izražen je i u uslovima sna i anestezije. Teta ritam povećava kapacitet učenja i kod dece je on izraženiji i češći nego kod odraslih. Kod pacova se on javlja prilikom njuškanja i kretanja. Alfa (α) ritam kod čoveka je prvi opisao Hans Berger 1931. godine pa se po njemu zove i Bergerov ritam. On obuhvata frekventnu oblast od 8-12 Hz. Najzastupljeniji je u toku fizičke relaksacije i budnosti bez mentalne aktivnosti i to iznad parijetalno-okcipitalne oblasti. Kod glodara aktivnost u ovom frekventnom opsegu se naziva sigma (σ) ritam. Beta (β) ritam obuhvata frekventno područje od 13-30 Hz. Ovaj ritam je povezan sa mentalnom aktivnošću i treba ga razlikovati od miogene aktivnosti. Ovaj ritam je najbolje izražen u frontalnim i parijetalnim delovima kore velikog mozga. Gama (γ) ritam obuhvata visokofrekventni domen počev od 32 Hz. U nastanku gama ritma doprinose promene u neurotransmitterskoj aktivnosti glutamata i gama-aminobuterne kiseline (GABA).

2.2.2. Analiza EEG-a i ECoG-a

EEG i ECoG su kompleksni signali čije statističke karakteristike zavise od prostora i vremena. Iako se oni stalno menjaju moguće je izvršiti podelu na periode. Analiza EEG i ECoG signala se vrši obično tako što se signal podeli na reprezentativne epohe sa manje-više konstantnim statističkim odlikama. Signal čija srednja vrednost i standardna devijacija ne zavisi od trenutka posmatranja naziva se stacionarnim. Relativno kratke epohe (do 10 s) snimljene pri istim uslovima su kvazistacionarne. Mc Ewen i Andersen su 1975. godine

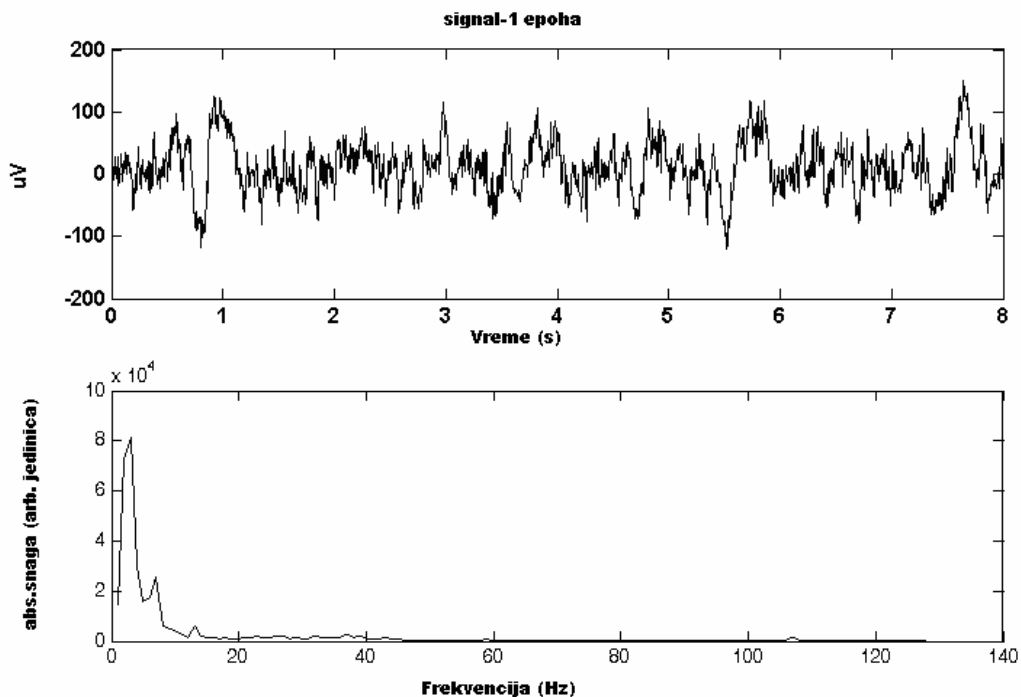
razvili metod za određivanje stacionarnosti epoha zasnovanom na izračunavanju amplituda i spektra snage i njihove statističke različitosti prema Kolmogorov-Smirnovom testu. Pri bilo kojoj analizi moraju se međutim uzeti u obzir i topografske karakteristike signala (Lopes da Silva, 1987).

Karakteristike nekog EEG ili ECoG signala nije moguće predviditi i zbog toga se on posmatra kao slučajaj tj. stohastički proces. Ipak je moguće odrediti neke parametre kao što su prosečna amplituda ili prosečna frekvencija. Moguće je signal predstaviti matematičkim ili biofizičkim modelom. Biofizičke procese koji leže u osnovi EEG-a i ECoG-a treba shvatiti kao stohastičko-determinističke i vrlo složene. Stoga je moguće opisati ih jedino statističkim parametrizacijama. Postoji i matematički pristup u analizi signala gde se signal opisuje kao sistem diferencijalnih jednačina. Nervna aktivnost ispoljava haotično ponašanje, ali u relativno dugom periodu to ponašanje se može predviditi (Lopes da Silva, 1987).

EEG ili ECoG signal je predstavljen kontinuiranim varijacijama potencijala u funkciji vremena. U praksi kvantitativna analiza se danas vrši uz pomoć računara. Uz pomoć odgovarajuće aparature EEG i ECoG se registruje kao analogni signal. Prvi korak u analizi signala predstavlja analogno-digitalna (AD) konverzija, jer je samo u digitalnom obliku signal prepoznatljiv računaru. Osnovna funkcija AD konverzije je da se kontinuirani EEG signal u prostoru i vremenu prevede u sistem diskretnih numeričkih vrednosti. AD konverzija se vrši uz odgovarajuću frekvenciju uzorkovanja - semplovanja. Naime u odgovarajućim vremenskim intervalima se beleže numeričke vrednosti potencijala. Da bi signal bio što vernije preveden iz analogne u digitalnu formu potrebno je odabiranje vršiti uz odgovarajuću frekvenciju semplovanja. Prema Nikvistovoj teoremi frekvencija semplovanja treba da bude bar dvostruko veća od najbrže komponente u zapisu, tj. $f_s \geq 2 f_{max}$. Numeričke vrednosti se u računaru memorišu u vidu binarnog koda. U digitalnom obliku zapis se dalje matematički analizira. Digitalizovane vrednosti EEG signala mogu se posmatrati kao slučajna promenljiva i mogu se predstaviti histogramom.

U analizi signala najpre treba voditi računa o uslovima registrovanja. U kliničkoj praksi obično se vrši snimanje signala pomoću 16 elektroda postavljenih prema izvesnom pravilu uzimajući u obzir problem zapreminske provodljivosti. Drugi problem je odrediti frekvenciju semplovanja prema Nikvistovoj teoremi. To znači da je potrebno uočiti najvišu frekvenciju signala. Ovaj problem se ne može iskustveno rešiti, već postoji teorijsko rešenje zasnovano na modelu zapreminske provodljivost mozga. Najviša frekvencija se javlja u slučaju kad je dipol najbliži površini mozga. Pre semplovanja sve frekvencije više od ove potrebno je ukloniti primenom odgovarajućih filtera.

Iako EEG ili ECoG signal predstavlja stohastički proces diskretne vrednosti EEG signala ipak su u izvesnom stepenu zavisne. Najjednostavniji način da se opiše ova zavisnost je da se posmatraju srednje vrednosti signala i da se odredi kovariansa, korelacija ili spektar. Određivanje kovarianse između dve promenljive zahteva usrednjavanje vrednosti izvesnog broja realizacija. Drugi način je da se posmatra zbir proizvoda odbiraka ulaznog signala i odbiraka tog istog signala ili signala sa nekog drugog kanala pomerenih za neku vrednost τ duž vremenske ose i to je autokorelacija ili kroskorelacija, respektivno. Treći način je opisivanje preko spektra snage. Spektar snage je funkcija frekvencije i daje distribuciju kvadrata amplitude u zavisnosti od frekvencije. Na slici 2 prikazana je epoha od 8 s ECoG zapisa moždane aktivnosti pacova tretiranog aluminijumom i njen spektar snage.



Slika 2. ECoG pacova tretiranog aluminijumom (epoha od 8s) i odgovarajući spektar snage

2.3. POSEBNOSTI I RAZLIKE U ELEKTRIČNOJ AKTIVNOSTI VELIKOG I MALOG MOZGA

Elektrokortikalna aktivnost kore velikog i malog mozga odražavaju razlike u tipu neurona kao i u funkcionalnoj aktivnosti kore. Takođe princip obrade senzomotornih draži se međusobno razlikuje kod kore velikog i malog mozga. Kod kore velikog mozga elektrokortikalna aktivnost predstavlja aktivnost neurona kore velikog mozga i to uglavnom piramidalnih neurona. Kora malog mozga je troslojna i sastoji se iz sloja Purkinjeovih neurona, granularnog sloja i molekularnog sloja sa inhibitornim i ekscitatornim neuronima. Aktivnost kore malog mozga predstavlja aktivnost neurona sva tri sloja. Ujedno ECoG kore malog mozga obuhvata procesuiranje informacija od ulaza do izlaza iz kore malog mozga. Funkcionalno kora velikog mozga na primljene draži odgovara sumacijom akcionih

potencijala piramidalnih neurona dok je izlaz iz kore višestruk i ide ka različitim centrima u mozgu. U uslovima anestezije imamo odsustvo draži i stimulaciju inhibitorne neurotransmisije. Aktivnost kore kako velikog tako i malog mozga pod anestezijom podrazumeva spontanu aktivnost neurona bez ulaznih i izlaznih signala. Takođe je u uslovima anestezije izmenjene su i veze sa drugim strukturama mozga što dovodi do fluktuacija spontane električne aktivnosti kore.

2.4. NEUROTOKSIČNOST ALUMINIJUMA

Aluminijum je trovalentni katjon široko rasprostranjen u zemljištu i vodi. Oko 8% zemljine kore čine minerali aluminijuma. Najčešći put usvajanja aluminijuma od strane bioloških sistema je u obliku hidroksida. U jonskoj formi prisutan je u tkivima biljaka i životinja. Bitan je za održavanje jonske homeostaze i kao i svi metali u većim dozama dovodi do intoksikacije. Kod ljudi simptomi trovanja su gastrointestinalni problemi, narušavanje Ca^{2+} homeostaze, nervoza, anemija, glavobolje, smanjena funkcionalnost jetre i bubrega, gubitak memorije, problemi sa govorom, osteroporoza i mišićna slabost. Neurotoksičnost aluminijumom je primećena u brojnim oboljenjima kao što je Alchajmerova demencija i Parkinsonizam (Percy ME., 2011; Kawahara M., 2005). Molekularni mehanizmi neurotoksičnosti aluminijuma su predmet intenzivnih istraživanja.

U ovom radu, primenjen je animalni model kojim se definiše neurotoksičan efekat aluminijuma i njegova korelacija sa neurodegenerativnim promenama koje se javljaju kod Alchajmerove i Parkinsonove bolesti. Akumulacija aluminijuma u mozgu može izazvati sinaptička pražnjenja i mentalnu disfunkciju (Connor DJ., 1988). Toksičnost aluminijumom može biti akutna ili hronična. Drugi događaji, kao što je stres i slično, narušavaju integritet krvno-moždane barijere što prethodi akumulaciji aluminijuma u mozgu (Shcherbatykh I., 2007). Aluminijum se neravnomerno raspoređuje u mozgu i najviše deponuje u kori velikog mozga. Dozna tolerancija nije precizno definisana. Prosečan unos aluminijuma je 3-10 mg aluminijuma dnevno kod odraslih osoba (WHO, 1997). Već ove doze mogu imati

toksičan efekat kod fetusa. Dozna zavisnost aluminijuma na osnovu proračuna na modelu pacova je:

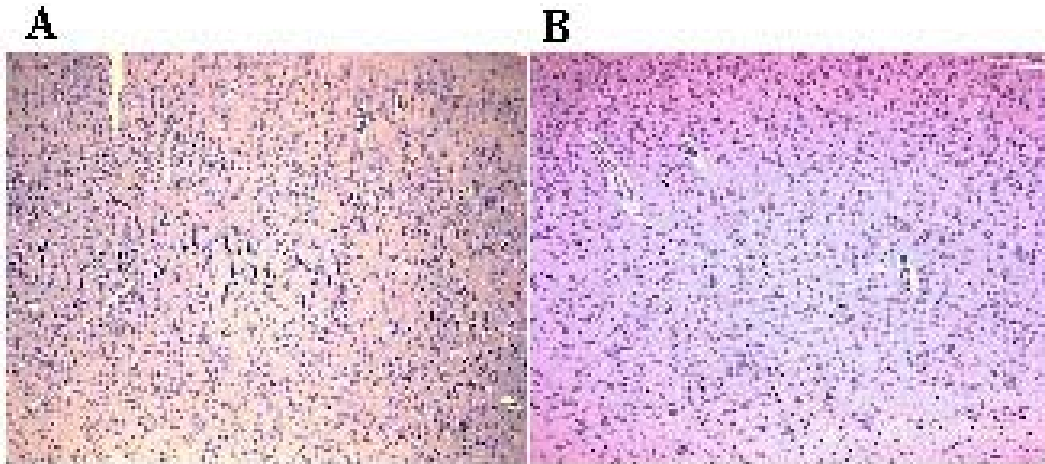
- akutna doza je 200-1000 mg/kg (Who,1997)
- hronično unošenje je 0-5 mg/l dnevno (Schroeder,1975)
- tolerantnost je 288 mg/kg hrana (Hicks,1987), 260 mg/kg voda (Gomez,1986)
- gestacija i laktacija - 52 mg/kg nije fetotoksično (Domingo,1987)

133 mg/kg fetotoksično (Gomez,1990,1991)

200 mg/kg neurotoksičnost (Commissaris, 1982)

U našem istraživanju vršena je procena doze koja dovodi do manifestacije oboljenja. Neurotoksični efekti na animalnom modelu se postižu nešto višim dozama u odnosu na najmanju efektivnu dozu kako bi se obezbedila učestalost promene usled toksičnosti u eksperimentalnoj grupi životinja. Ovakav tretman pokazuje i odgovarajuću varijabilnost kao i stepen tolerancije. Usled neravnomernog metabolizma i akumulacije u tkivima mogu se javiti odstupanja. Neurotoksičnost podrazumeva narušavanje jonske homeostaze u mozgu kojoj prethodi promena integriteta krvno-moždane barijere usled stresa. Promene u ponašanju su jasan pokazatelj intoksikacije, a spektralna analiza ukazuje da usporenje komponenti spektra i povećanje relativne spektralne snage u θ opsegu je u korelaciji sa toksičnim promenama.

Kao posledica neurotoksičnosti aluminijuma javlja se citotoksičnost, neurodegeneracija i apoptoza. Ove promene su sekundarni događaji u razvitku neurotoksičnosti i moguće ih je histološki pokazati (Slika 3).



Slika 3. Tamni neuroni cerebralnog korteksa kod aluminijumom tretiranog pacova (A) i kod kontrolne životinje (B)

2.5. Animalni modeli

Animalni modeli su eksperimentalne životinje odgovarajućih bioloških karakteristika dobijenih u laboratorijskim uslovima, koje se koriste u istraživanjima bolesti ili procesa kod ljudi. Postoje tri tipa animalnih modela i to su homologi, izomorfni i prognostički tip. Sva tri tipa predstavljaju animalne modele bolesti kod ljudi, ali ih opisuju na tri različita načina. Homologi tip podrazumeva isti protokol kao i kod pacijenta. Izomorfni tip ima tretman i simptome iste kao i u oboljenju. Prognostički tip podrazumeva isti tretman modela kao i kod ljudi. Biološki eksperimentalna životinja je genetički i neurološki drugačija u poređenju sa humanom vrstom, što omogućava zaštitu ljudi pri eksperimentu. Postoje različiti animalni modeli od kojih se primena glodara pokazala kao najpraktičnija sa obzirom na visoku adaptabilnost, veliki reproduktivni potencijal, stabilan i sličan genom kod okota i plastičnost nervnog sistema. Takođe, glodari su ekonomični za gajenje i održavanje u eksperimentalnim uslovima. O značaju primene govore i podaci o broju glodara u istraživanjima. U SAD se godišnje koristi 15-20 miliona glodara u biomedicinske svrhe. S obzirom na prirodu izučavanja animalni modeli bolesti su simptomatološki,

genetički ili modeli ponašanja. Tako se kao simptomatološki model na primer koristi metrazol za indukciju epilepsije (White HS., 1997), modeli infekcija Plazmodijumom za malariju (Hisaeda H., 2004; Coppi A., 2006; Frischknecht F., 2006), ovarijsktomija kao model osteroporoze, zračenje za indukciju tumora i sl. Genetički modeli su modeli dobijeni ukrštanjem u laboratorijskim uslovima sa ekspresijom specifične funkcije gena ili mogu biti tipovi fenotipa koji se statistički analiziraju. Tako se na primer, koriste heterozigoti APP23 miševi kao modeli neurodegeneracije (Van Dam D., 2003) ili višestruko transgeni miševi sa AD patologijom (Bloom F., 2005). Modeli ponašanja su imitacije izmenjenog stanja usled bolesti i najučestaliji tip je model depresije (Hasler G., 2004).

U našoj studiji su korišćene životinje - pacovi soja Wistar i Sprague Dawley gajeni u povoljnim uslovima na temperaturi 21-24°C, sa neograničenim pristupom hrani i vodi, po 1 ili više u kavezu. Wistar pacovi imaju nagomilane recesivne osobine te mogu pokazati različite oblike ponašanja ali genetička struktura korišćenih pacova pokazuje malu varijabilnost u odnosu na motorne karakteristike ponašanja koje su praćene u eksperimentu. Eksperimentani animalni model na pacovu, korišćen u ovoj tezi, podrazumeva primenu aluminijuma sa varijacijama u dozi, dužini tretmana i načinu aplikacije. Korišćen je aluminijum heksa hidrat koji je aplikovan intraperitonealno ili davan *per os*. Ovakav model pruža mogućnost analize individualnih varijeteta, grupnih osobina i aproksimaciju na populaciju. Time se postiže mogućnost definisanja dozno-zavisnih parametara. Takođe, korišćene su i različite starosne grupe, kako bi se definisao odgovor na individualni varijetet. Sa medicinskog aspekta moguće je govoriti o efektima neurotoksičnosti, kao i o patofiziološkim promenama. Elektrokortikalno registrovanje putem elektroda pozicioniranih u parijetalnoj kori velikog mozga i korteksu malog mozga istovremeno, pruža mogućnost uvida u dejstvo određenih doza aluminijuma na različite regione mozga kao i definisanje plastičnosti preko senzo-motorne funkcije.

Svi eksperimenti su rađeni pod anestezijom i registrovanje je vršeno pod istim eksperimentalnim uslovima. Anestezija je korišćena u eksperimentu da bi se eksperimentalne životinje što manje izlagale bolu i manje patile. Različiti anestetici su korišćeni kako bi se mogao pratiti tok registrovanja (vremensko-prostorni gradijent) i kako

bi se komparacijom moglo definisati stanje približno normalnom stanju budnosti. Odsustvo kretnji omogućava praćenje spontane aktivnosti malog mozga, a reaktivnost i pomeraji su u korelaciji sa pragom senzitiviteta. Ovakav model je pogodan za procenjivanje efekata neurotoksičnosti sa više aspekata.

Model aluminijumske neurotoksičnosti izazvane aplikacijom aluminijuma korišćen je u elektrofiziološkoj analizi ECoG aktivnosti (Martać Lj., 2006). ECoG registrovanje parietalne kore velikog mozga i paravermalnih malomoždanih struktura je vršeno pod Nembutalnom ili Zoletilnom anestezijom.

2.6. Linearne i nelinearne metode u analizi električne moždane aktivnosti

Sa obzirom na svojstva biosignala nastalih snimanjem pojedinačne ili grupne aktivnosti neurona razvijene su brojne linearne i nelinearne metode analize. Među njima su spektralna i fraktalna analiza koja je već primenjivana u našim ranijim studijama lezije mozga (Ćulić M., 2005; Spasić S., 2005, 2008). Spektralna analiza zasnovana na brzom Furijejevom transformaciji pruža podatke o promeni spektralne snage u određenim frekventnim opsezima. Fraktalna dimenzija računata prema Higučijevom metodu (Higuchi T., 1988.) predstavlja dobar pristup za selekciju različitih patofizioloških stanja u modelu neurotoksičnosti.

Spektralna analiza je neparametarski metod analize EEG i ECoG signala zasnovana na Furijevoj transformaciji. Furijeova transformacija je matematički metod koji se često koristi u analizi EEG-a i drugih bioloških signala (Harris CM., 1998). Osnovna ideja je da se signal iz vremenskog prevede u frekventni domen tj. prevede u spektar snage. U Furijevoj transformaciji polazi se od činjenice da se EEG zapis može predstaviti kao Furijeov red tj. kao suma *sin* i *cos* funkcija koje se razlikuju po amplitudi i po periodu.

$$X(t) = a_0 + \sum a_n \cos(nwt) + \sum b_n \sin(nwt)$$

gde su a_0 , a_n , b_n amplitude, n je prirodan broj, w je frekvencija, a t vremenska promenljiva.

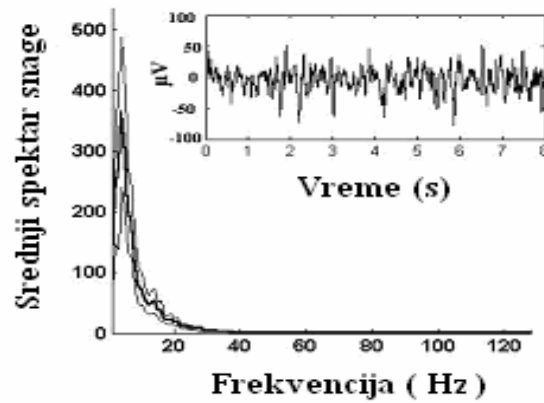
Sledeći korak u Furijeovoj transformaciji predstavlja uvođenje kompleksnih brojeva:

$$Z_n = a_n + jb_n$$

Prva komponenta kompleksnog broja je realna, a druga komponenta kompleksnog broja je imaginarna. Amplituda je jednaka modulu kompleksnog broja. Krajnja jednačina koja definiše Furijeovu transformaciju za aperiodične funkcije je:

$$f(x) = \int x(t)e^{-j\omega t} dt$$

Analiza EEG signala u frekventnom domenu datira još iz 1960. godine (Hirai T., 1960). Spektralna analiza EEG signala razvijena je 70-tih godina (Banquet J.P., 1972). Danas je upotrebom računara ovaj metod u ekspanziji (Kušić D., 1994). Takođe, moguće je vršiti i višekanalno registrovanje. U našoj studiji u analizi signala koristili smo amplitudni spektar i spektar snage. Obično se signal posmatra u optimalnim epohama dužine od 8-10 s. Prvo pitanje koje se nameće posmatrajući amplitude u epohama je da li je njihova distribucija normalna. Za testiranje distribucije se koristi Kolmogorov-Smirnov test. Analiza intervala spektra EEG-a ispitanika je metod koji su razvili Saltzberg i Burch 1985. godine i pogodna je za uočavanje promena dejstva psihoaktivnih lekova, promena u toku anestezije, u psihijatriji, ispitivanju spavanja i slično. U praksi se često kao ograničavajući faktor pri ovakvoj analizi javlja pojava artefakta. Artefakt je struja tj. napon nebiološkog porekla nastala usled aktivnosti vanmoždanih izvora. Artefakti mogu biti prema poreklu fiziološki ili nefiziološki. Spektri snage su najpogodniji metod u frekventnoj analizi EEG i ECoG. Dobijaju se Furijeovom transformacijom i daju zavisnost snage (pW) u funkciji frekvencije (Hz). Dužina epohe je poželjno da bude 5-10 s kako bi se obezbedila stacionarnost signala u određenom segmentu. Grafički prikaz pruža podatke o raspodeli frekvencija. Program analize spektara snage daje i statistički obrađene podatke po frekventnim područjima uz standardnu devijaciju za skup epoha. Moguće je procentualno odrediti vrednosti snage u intervalima kao i dominantnu frekvenciju i njeno procentualno učešće. Ovi podaci se porede statističkim testovima kako bi se dokazale razlike u različitim eksperimentalnim uslovima ili razlike u aktivnosti leve i desne hemisfere.



Slika 3. Srednji spektar snage prikazanog elektrokortikograma (ECoG-a, gore desno) i njegova standardna devijacija.

Fraktalna analiza spada u grupu nelinearnih metoda analize EEG-a i ECoG-a. Biološki signali imaju neke fraktalne karakteristike (Mandelbrot BB., 1982). Svojstvo samosličnosti signala može se opisati fraktalnom dimenzijom (Higuchi T., 1988; Katz M., 1988; Petrosian A., 1995). Fraktalna dimenzija može da se menja u zavisnosti od fiziološkog stanja i može biti dobar pokazatelj izmenjenog patofiziološkog stanja, npr. anestezija (Keković G., 2010; Spasić S., 2011), fokalna povreda (Spasić S., 2008), epilepsija (Indiradevi KP., 2009), demencija (Jeong J., 2001) i dr.

3. CILJ

Spektralna analiza ECoG-a mozga pacova u animalnom modelu neurotoksičnosti izazvane aluminijumom ima za cilj da ispita promene u aktivnosti mozga u uslovima intoksikacije. U tom smislu ispitivano je više pokazatelja neurotoksičnosti:

- Efekat na ceo mozak i patofiziološko stanje neurotoksičnosti,
- Razlike i osobenosti velikog i malog mozga u uslovima intoksikacije,
- Efekat toksičnosti i dozna zavisnost,
- Promene neurona u uslovima toksičnosti, i
- Kompenzacioni mehanizmi plastičnosti i adaptabilnosti.

Spektralna analiza pruža kvalitativni opis promene neurofiziološkog stanja. Statistički parametri ukazuju na varijaciju promene u grupi jedinki.

Fraktalna dimenzija opisuje kvantitativnu promenu funkcije mozga u stanju neurotoksičnosti. Na osnovu fraktalne dimenzije moguće je ispitati:

- Tip promene (akutna ili hronična toksičnost),
- Različita patofiziološka stanja,
- Prag toksičnosti, dozni efekat i granice prilagodljivosti, i
- Sličnost i razlike u neurotoksičnosti pojedinih moždanih struktura.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Eksperimentalne životinje i animalni model

U eksperimentalnom radu korišćeni su pacovi Wistar i Sprague Dawley soja. Životinje su gajene u kavezima, 12 sati izložene svetlosti i 12 sati u mraku sa neograničenim pristupom briketiranoj hrani i vodi, na temperaturi od 18 do 21 °C. Svi eksperimenti su izvedeni u skladu sa normama koje je odobrio Etički komitet Instituta za Biološka istraživanja "Siniša Stanković". Animalni model toksičnosti dobijen je tretiranjem pacova aluminijumom.

Prvu grupu eksperimentalnih životinja predstavljaju odrasli pacovi Wistar soja. Ovaj soj ima dosta recesivnih osobina i stereotipno ponašanje te je pogodan za izučavanje ponašanja. U zavisnosti od uslova gajenja (po grupama u kavezima ili odvojeno samo jedan pacov u kavezu) mogu ispoljiti stres ili depresiju. Drugu grupu eksperimentalnih životinja predstavljaju ženke soja Sprague Dawley. Ovaj soj je spontano hipertenzitivan i po pravilu senzibilniji na stres. Ženke su sparivane sa mužjacima iz istog okota. Tretman aluminijumom davanim *per os* nastavljen je i u toku gestacije i laktacije. Mladunci su registrovani elektrokortikografski i praćena je promena motorne funkcije u razviću usled toksičnosti.

Svi pacovi su preživeli eksperimentalno ECoG registrovanje, a neki su žrtvovani i rađena je histološka analiza smanjenja, degeneracije i promene neurona u neokortikalnom, hipokampalnom i malomoždanom regionu.

Animalni model korišćen u ovoj studiji je pogodan za izučavanje više biomedicinskih fenomena, kao sto su: adaptabilnost u grupi, plastičnost mozga, efekti neurotoksičnosti, patofiziološko stanje, frekventna analiza, izučavanje neuronske mreže itd. Sa obzirom na stereotipno motorno ponašanje promene aktivnosti malog mozga su vezane za adaptabilne promene usled toksičnosti kod mužjaka soja Wistar i one su uniformne u grupi. Kako toksičnost mozga izazvana aluminijumom pogađa ceo mozak promena aktivnosti velikog mozga koji je osetljiviji u odnosu na mali mozak kod prve

grupe pacova je u vezi sa plastičnošću nervnog sistema, a kod druge grupe se odražava na aktivnost i promenu u okviru cele cerebralno-cerebelarne mreže. Pri većim dozama primećene su promene ponašanja koje odgovaraju patofiziološkom stanju akutne ili hronične intoksikacije.

4.1.1. Eksperimentalna procedura davanja aluminijuma i doziranje

Za eksperimente su korišćeni pacovi počev od starosti 2-3 meseca, telesne mase 200-350 g, gajeni u skladu sa normama etičkog komiteta. Kontrolnu grupu čini 16 mužjaka Wistar soja pacova. Prvu tretiranu grupu predstavljaju mužjaci Wistar soja (n=39) tretirani rastvorom aluminijum-heksahidrata u dozi od 2, 3, 4 ili 6 mg Al/kg dnevno. Pacovi su tretirani intraperitonealnim ubrizgavanjem rastvora aluminijum heksahidrata. Postupak je trajao najmanje 4 a najviše 6 nedelja. Prvi znaci intoksikacije su primećeni već nakon 2 nedelje. U toku tretmana praćena je promena telesne mase. Ovakav animalni model je pogodan za izučavanje efekta neurotoksičnosti aluminijuma na moždanu aktivnost. Treba napomenuti da je usled neravnomerne distribucije aluminijuma u organizmu i njegovog metabolizma potrebna nešto veća doza kako bi se postigao neurotoksični efekat. Zbog toga je moguće govoriti o najmanjoj toksičnoj dozi i efektivnoj dozi toksičnosti.

Drugu grupu predstavljaju ženke Sprague Dawley soja (n=11) koje su počev od starosti 2-2,5 meseci tretirane aluminijumom *per os*, a kontrolnu grupu čini 10 mladunaca starosti 4-5 nedelja soja Wistar. Ženke su tretirane aluminijumom putem vode za piće. Korišćen je 1,5% rastvor aluminijuma. Naime ženke su sparivane sa mužjacima i odvojene u zasebne kaveze. Tretman je trajao i za vreme nošenja mladunaca. Nakon gestacije i laktacije obe grupe mladunaca (kontrolna i tretirana aluminijumom) su elektrokortikografski registrovane.

4.2. Eksperimentalni protokol i operativna procedura

U eksperimentu su korišćene životinje tretirane aluminijumom kao i kontrolne netretirane životinje iste starosti. Operativna procedura i registrovanje su sprovedeni na anestetiziranim životinjama. Životinje su najpre postavljene u stereotaksički ram. Zatim je rađena kraniotomija i postavljanje elektroda. Za anesteziju su korišćeni sledeći anestetici u navedenim dozama: Nembutal (Napentobarbital, SERVA, Heidelberg, Nemačka) u dozi od 45 mg/kg ili Zoletil (Virbac S., A. Carros, Francuska) u dozi od 60 mg/kg. U toku eksperimenta po potrebi je dodavana anestezija u dozi od oko 8mg/kg. Anestetizirana životinja je zatim fiksirana u stereotaksički ram radi izvođenja operativne procedure kraniotomije. Kraniotomija je rađena na parijetalnim kostima bušenjem kružnih rupica dijametra 2 mm čije su koordinate: 2-2,5 mm posteriorno od bregme i 2 mm lateralno od sagitalne suture i 10,5 mm posteriorno od bregme i 1,5 mm lateralno od sagitalne suture (Paxinos i Watson, 1982).

4.3. Registrovanje električne moždane aktivnosti i akvizicija ECoG signala

Eksperimentalne životinje su nakon tretmana aluminijumom podvrgnute elektrokortikalnom registrovanju. Uslovi registrovanja su uniformni za sve životinje i rađeni su pod anestezijom. Registrovanje je vršeno pod istim uslovima i u grupi kontrolnih životinja iste starosti, koje nisu tretirane aluminijumom.

Registrovanje aktivnosti parijetalne kore velikog mozga i kore malog mozga vršeno je volframskim elektrodama postavljenim 0,5-1,5 mm duboko u koru mozga. Signali su praćeni na osciloskopu (Textronix, SAD). Pojačavanje signala je vršeno pojačivačem Multi Channel Processor-Plus (Alpha Omega Engineering, Izrael). Filtriranje signala vršeno je sa parametrima: DC za visokopropusni filter i 150 Hz za niskopropusni filter. Ceo eksperiment registrovanja aktivnosti kore mozga je vršen u trajanju od 30-120 min. Registrovanje aktivnosti mozga rađeno je na svakih 5-10 min u trajanju od 121 s. Analogno-digitalna konverzija je vršena pri frekvenciji semplovanja od 256 Hz.

Registrowanje je vršeno sa 4 volframske elektrode i jednom elektrodom za uzemljenje. Svi signali su registrovani programom za akviziciju signala SIGVIEW (Jovanović A., 2004).

Ovakav protokol ECoG registrovanja je pogodan za praćenje grupe aktivnosti neurona. Moguće je izvršiti transformaciju signala u EEG i pratiti aktivnost lokalnog kola preko sumacije veza neurona sa istim ekscitatornim (EPSP) i inhibitornim (IPSP) postsinaptičkim potencijalom. Registrovanjem parijetalne kore i malog mozga može se analizirati senzo-motorna funkcija kao i spontana aktivnost u odsustvu senzo-motorne draži. Eksperimenti registrovanja pojedinačne životinje mogu se ponavljati i na taj način pratiti vremenska varijabilnost promene u akutnim i hroničnim uslovima.

Registrovani signali u trajanju od 121 s su memorisani u računaru u vidu binarnih datoteka. Za svaki registrovani signal vršena je Fourieova transformacija za 15 epoha u trajanju od 8 s. Dobijeni spektri snage su poređeni i izračunata je srednja vrednost i standardna devijacija. U okviru analize spektara posmatrana je relativna spektralna snaga po frekventnim oblastima: delta (0,1-4 Hz), teta (4,1-8 Hz), sigma (8,1-15 Hz), beta (15,1-32 Hz) i gama oblast (iznad 32 Hz).

Analiza registrovanih signala elektrokortikalne aktivnosti kore velikog i malog mozga vršena je programima u Fortranu pod operativnim sistemom DOS i u programu Matlab 6.5. pod operativnim sistemom Windows. Korišćeni su programi dizajnirani od strane saradnika neurofiziološke laboratorije (dr B. Janković, dr A. Kalauzi, Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu). Registrovani signali su filtrirani na 50, 60 i 101 Hz i eventualne nepravilnosti (drift, smetnje i pomeraji) su izbačeni iz analize.

4.4. Spektri snage u analizi ECoG-a

Signali su registrovani u trajanju od 121 s pri frekvenciji smplovanja od 256 Hz. Brza Furijeova transformacija je rađena na epohama u trajanju od 8 s. Svaki pojedinačni signal podeljen je na 15 epoha. Vršeno je usrednjavanje i izračunavanje standardne devijacije spektra snage za 15 epoha svakog signala. Aktivnost mozga eksperimentalne životinje

praćena je u vremenu trajanja eksperimenta. Praćen je prikaz promene aktivnosti mozga u zavisnosti od anestezije i eksperimentalnih uslova. Ovako dobijeni signali su grupisani za svaku eksperimentalnu životinju. Poređenje je vršeno u odnosu na vrednosti kontrolnih tj. netretiranih životinja, a izbor datoteka je vršen u zavisnosti od veličine promene relativne spektralne snage u delta oblasti koja je najvarijabilnija.

Kako bi se umanjio efekat anestezije posmatrana je spontana aktivnost grupe neurona malog mozga u uslovima odsustva senzo-motorne reakcije i najmanja aktivnost je posmatrana kao posledica dejstva anestezije, dok pražnjenja odgovaraju tipu blokade anestezije.

4.5. Fraktalna dimenzija u analizi ECoG-a

Fraktalna analiza spada u grupu nelinearnih metoda analize EEG-a i ECoG-a. Fraktalna dimenzija je računata upotrebom programa koji koristi Higučijev metod (Spasić i sar., 2005, 2008, 2011).

Koristeći modifikovan Higučijev metod originalno opisan u (Higuchi T., 1988.) različiti elektrofiziološki signali (EEG) su analizirani računanjem fraktalne dimenzije (FD). EEG je predstavljen kao vremenska serija $x(1), x(2), \dots, x(N)$, i mi smo konstruisali k novih samo-sličnih vremenskih serija x_k^m .

$$x_k^m : \quad x(m), \quad x(m+k), \quad x(m+2k), \quad \dots, \quad x(m+\text{int}[(N-m)/k]k), \quad (1)$$

za $m = 1, 2, \dots, k$ gde je m početno vreme; $k = 1, \dots, k_{\max}$, i k je vremenski interval, a $\text{int}(r)$ je celobrojni deo realnog broja.

$L_m(k)$ je izračunato za svaku od k vremenskih serija odnosno krivih x_k^m .

$$L_m(k) = \frac{1}{k} \left[\left(\sum_{i=1}^{\text{int} \left[\frac{N-m}{k} \right]} |x(m+ik) - x(m+(i-1)k)| \right) \frac{N-1}{\text{int} \left[\frac{N-m}{k} \right] k} \right] \quad (2)$$

$L_m(k)$ je usrednjena za svako m , formirajući srednju vrednost za $L(k)$ za svako $k=1, \dots, k_{\max}$ kao

$$L(k) = \frac{\sum_{m=1}^k L_m(k)}{k} \quad (3)$$

Time je formiran niz srednjih vrednosti $L(k)$ i vrednost fraktalne dimenzije FD je izračunata kao nagib najbolje prilagođene regresione linije metodom najmanjih kvadrata iz odnosa $\ln(L(k))$ i $\ln(1/k)$:

$$FD = \ln(L(k)) / \ln(1/k) \quad (4)$$

Veličina nepreklapajućeg prozora iznosila 200 tačaka, što pri frekvenci uzorkovanja od 256 Hz odgovara epohi trajanja od 0,78 sekundi. Za vrednost parametra k_{\max} odabrana je optimalna vrednost $k_{\max}=8$ (Spasić S., 2005a). Na osnovu dobijenih vrednosti fraktalne dimenzije pojedinačnih prozora, izračunavana je srednja vrednost i standardna devijacija fraktalne dimenzije celog signala. FD signala je računata korišćenjem programa razvijenih za potrebe ove analize (autor dr S. Spasić) u MatWorks, MatLab 6.5 i potom statistički testirana. Teoretske vrednosti fraktalne dimenzije kreću se u intervalu od 1,00 do 2,00.

Fraktalna dimenzija predstavlja meru samosličnosti i kompleksnosti signala. Vrednosti FD se menjaju u različitim fiziološkoim stanjima te se može koristiti u opisu izmenjenih tj. patofizioloških stanja (Spasić S., 2005a,b, 2008, 2011; Ćulić M., 2009; Keković G., 2010a,b). Promene u patofiziološkim stanjima intoksikacije mogu se opisati promenama fraktalne dimenzije.

4.6. Statička analiza

Spektar snage opisan je statističkim parametrima tj. srednjom vrednošću i standardnom devijacijom za 15 registrovanih epoha svakog pojedinačnog signala. Takođe je i za ceo postupak registrovanja jedne eksperimentalne životinje određivana srednja vrednost i standardna devijacija ili standardna greška. Ovakva deskriptivna analiza pruža podatke o raspodeli relativne spektralne snage po frekventnim oblastima. Ukoliko postoji

jednosmerna promena - samo porast ili samo smanjenje relativne spektralne snage koristi se standardna greška. U radu su korišćeni programi koji uz spektralnu analizu daju i statistički prikaz rezultata.

U populaciono sličnoj grupi jedinki sa sličnim osobinama delta ritma testiranje hipoteze o promeni bioloških parametara vršeno je ANOVA ili t testom. Ovi testovi ukazuju na promenu aktivnosti grupe neurona preko promene neurotransmitterske veličine ili sa obzirom na povezanost moždanih regiona na promenu funkcionalnosti ove veze. Samim eksperimentom su obuhvaćene obe promene aktivnosti mozga usled intoksikacije (Man-Vitni ili U test). Ovaj neparametarski test ukazuje na promene aktivnosti mozga u različitim frekventnim opsezima u određenoj grupi. Neurotransmitterska aktivnost i funkcionalna konektivnost su varijable koje opisuju fiziološku promenu usled intoksikacije. Anestezija, stres i akumulacija aluminijuma su promenljive u modelu intoksikacije aluminijumom koje zavise od uslova intoksikacije.

5. REZULTATI

U eksperimentu su korišćena dva različita soja pacova Sprague Dawley i Wistar kako bi se uočila individualna varijabilnost. Pacovi su tretirani aluminijumom intraperitonealno i *per os* da bi se uočio neurotoksični efekat tretmana. Korišćene su različite doze aluminijuma radi procene doznog efekta na razvoj toksičnosti. Registrovana je aktivnost kore velikog i malog mozga – leva i desna hemisfera kako bi se uočio selektivni efekat aluminijuma na pojedine delove mozga, a i senzo-motorna funkcija i plastičnost u uslovima intoksikacije. Korišćena su dva anestetika sa različitim inhibitornim dejstvom na neurotransmisiju kako bi se pratio efekat anestezije koji je umanjen (poređena je maksimalna vrednost delta ritma kod kontrole u odnosu na životinju koja se budi iz anestezije), jer iako neurotoksičnost i anestezija doprinose povećanju spektralne snage aktivnosti mozga u delta oblasti, mehanizmi njihovog dejstva su međusobno različiti i u suprotnosti. Osim kod odraslih pacova vršen je i tretman mladunaca u razviću (gestacija i laktacija) što ukazuje na različite mehanizme plastičnosti i adaptabilnosti nervnog sistema kod grupa različite starosti.

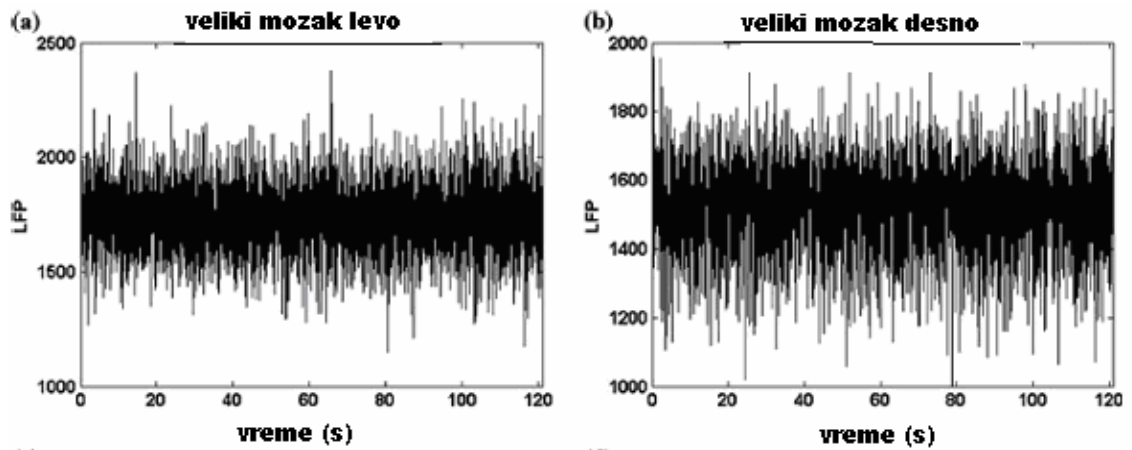
Dobijeni podaci o elektrokortikalnoj aktivnosti mozga pacova tretiranih aluminijumom su poređeni sa ECoG signalima registrovanim na kontrolnim pacovima iste starosti koji nisu tretirani aluminijumom, a podvrgnuti su istoj eksperimentalnoj proceduri registrovanja. Na osnovu poređenja određivane su najmanje, najveće i srednje vrednosti promene elektrokortikalne aktivnosti mozga pacova tretiranih aluminijumom. Preko definisanja najmanje promene aktivnosti kontrolnih pacova u uslovima buđenja određen je efekat anestezije na promenu frekventnog ritma i ta vrednost je posmatrana kao referentna kako bi se anulirao efekat anestezije. Osnovni nalaz je da tretman aluminijumom dovodi do povećanja relativne spektralne snage u delta opsegu kao i da promena odnosa delta - teta ritma ukazuje na efekat neurotoksičnosti. Registrovana je aktivnost parijetalne senzo-motorne kore i kore malog mozga i posmatrana je selektivna neurotoksičnost aluminijuma na različite delove mozga, a takođe je praćena i spontana aktivnost kore u odsustvu senzo-

motorne reakcije (blokada usled jake anestezije). U eksperimentima su korišćeni pacovi dva različita soja podvrgnuti različitom tretmanu i vršeno je poređenje aktivnosti mladunaca i odraslih jedinki. Pokazano je da su efekti neurotoksičnosti različiti u razviću i kod odraslih jedinki i da su mehanizmi reparacije (plastičnost nervne mreže i adaptabilnost funkcije) drugačiji u zavisnosti od starosti jedinke. Praćen je i efekat toksičnosti u zavisnosti od doze u grupi jedinki tretiranih različitim dozama aluminijuma. Razvoj akutne ili hronične toksičnosti doveden je u vezu sa patofiziološkim stanjem, a fraktalnom dimenzijom je opisana promena.

Animalni model neurotoksičnosti se pokazao kao pogodan za praćenje efekta neurotoksičnosti, aktivnosti mozga u različitim fiziološkim stanjima i praćenja patoloških promena. Takođe je izvršena i procena plastičnosti nervnog sistema i adaptabilnosti u okviru grupe. Sam model može da se koristi za analogiju sa neurodegenerativnim bolestima, stresom i intoksikacijom mozga. Ujedno je uporediv sa bolestima kao što je Alchajmerova demencija i Parkinsonizam.

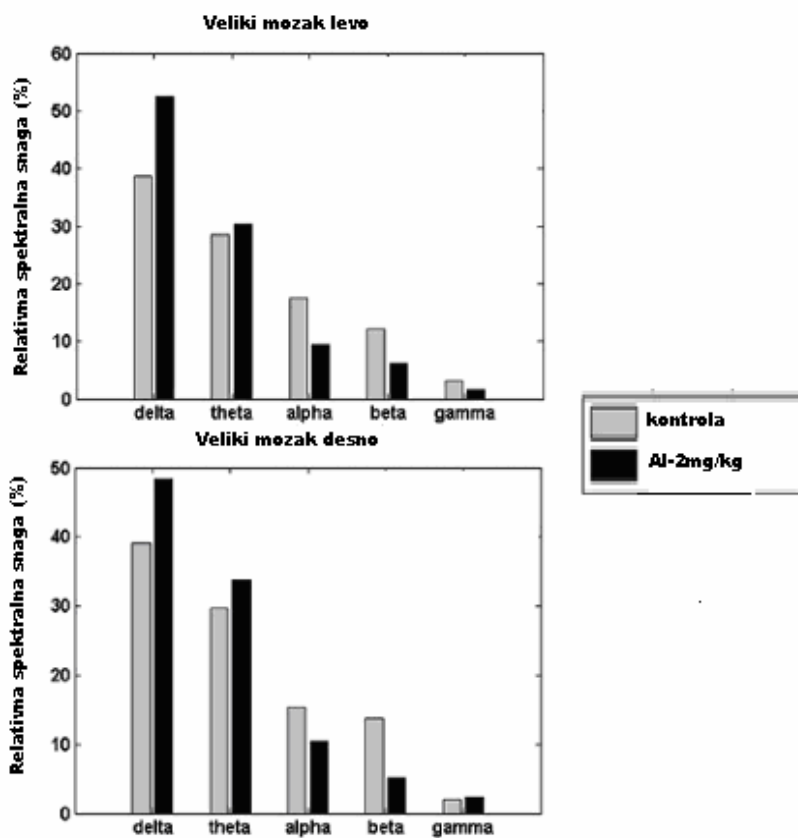
5.1. Spektralna analiza aktivnosti kore velikog i malog mozga pacova u kontrolnim uslovima i posle tretmana aluminijumom - prikaz po frekventnim opsezima

Na slikama 4 i 5 predstavljena je ECoG aktivnost velikog i malog mozga pacova tretiranog sa 2mg/kg aluminijuma dnevno u toku 4 nedelje (A2P) u odnosu na fiziološku kontrolu (K4D). Aktivnost mozga je izraz promena u neurotransmiterskoj aktivnosti grupe neurona kore velikog i malog mozga. Efekti stresa i anestezije su opisani i kod kontrolne životinje koja je tretirana neutralnim rastvorom intraperitonealno u toku 4 nedelje i registrovana pod istim uslovima. Oba pacova (kontrolni K4D i tretirani aluminijumom A2P) su anestezirana dozom od 35mg/kg Nembutala, a u zavisnosti od fiziološkog stanja dodavana je anestezija u dozi 8mg/kg.

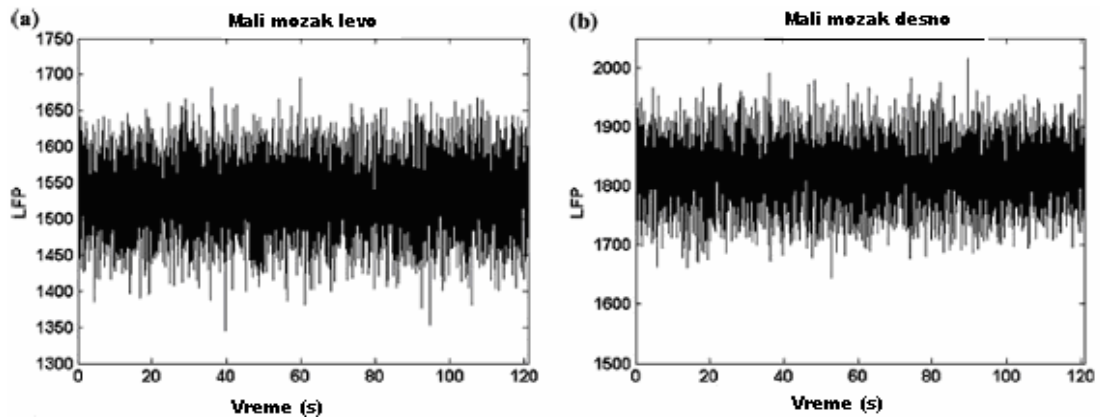


Slika 4. Tipična ECoG aktivnost velikog mozga levo (a) i desno (b) kod aluminijumom tretiranog pacova (2mg/kg Al).

Slike 4a i 4b prikazuju elektrokortikogram kod aluminijumom tretiranog pacova - veliki mozak levo i desno. Slika 5 predstavlja relativnu spektralnu snagu signala prikazanog na slikama 4a i 4b u eksperimentu A2P - veliki mozak levo i desno u poređenju sa kontrolnom netretiranom životinjom K4D.

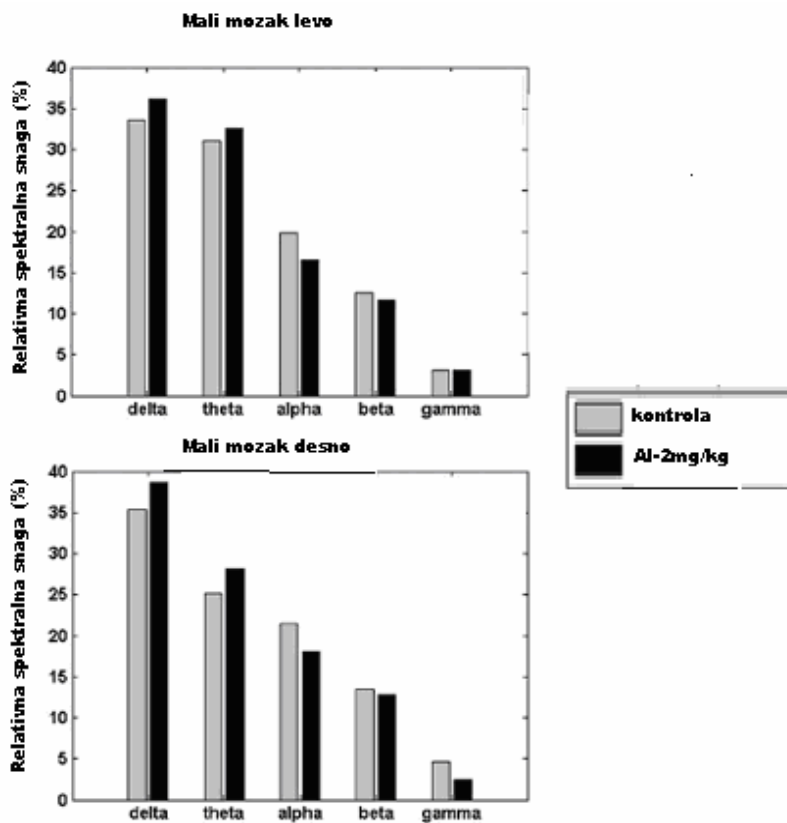


Slika 5. Relativna spektralna snaga ECoG aktivnosti velikog mozga levo i desno kod kontrolnog (K4D) i pacova tretiranog aluminijumom (A2P) prikazana po frekventnim opsezima.



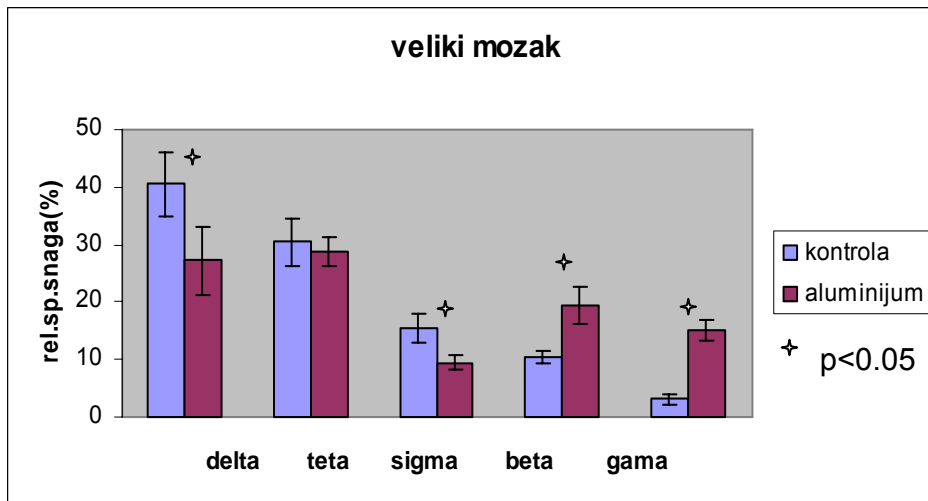
Slika 6. Tipična ECoG aktivnost malog mozga levo (a) i desno (b) kod aluminijumom tretiranog pacova (2mg/kg Al).

Slike 6a i 6b prikazuju elektrokortikalnu aktivnost malog mozga pacova A2P – levo i desno. Slika 7 predstavlja relativnu spektralnu snagu signala sa slike 6 u poređenju sa netretiranom kontrolom K4D. Na slikama 6 i 7 predstavljene relativne promene spektralne snage po frekventnim područjima za veliki i mali mozak u kontroli i tretmanu aluminijumom od 2mg/kg nisu pokazale primetne razlike u aktivnosti kore malog mozga leve i desne strane. Uočava da je aktivnost neurona kore i kod velikog i kod malog mozga povećana u delta i u manjoj meri, teta opsegu, dok je u srednjim i visokofrekventnim opsezima smanjena relativna spektralna snaga.

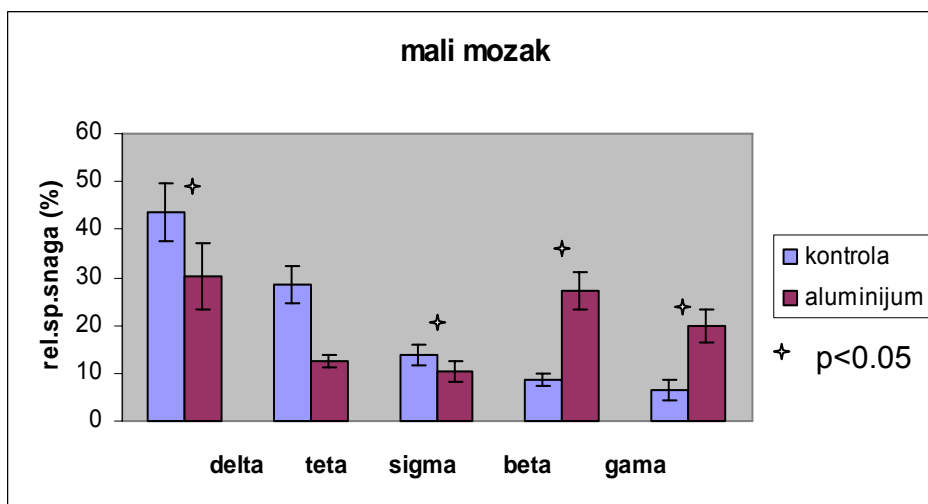


Slika 7. Relativna spektralna snaga ECoG aktivnosti malog mozga levo i desno kod kontrolnog (K4D) i pacova tretiranog aluminijumom (A2P) prikazana po frekventnim opsezima.

U grupama od 9 kontrolnih i 9 aluminijumom tretiranih pacova analizirane su promene u ritmovima neuronske aktivnosti. Posmatrane su vrednosti kontrole sa stabilnom blagom anestezijom i poređene sa grupom pacova intraperitoneano tretiranih aluminijumom u dozi od 2mg/kg (slika 8 i 9). Srednje vrednosti procentualne zastupljenosti pojedinačnih frekventnih opsega dobijene su iz po 20 eksperimenata u svakom eksperimentalnom uslovu tj. kontrola vs. aluminijumski tretman.



Slika 8. Relativna promena spektralne snage po frekventnim područjima za veliki mozak 9 kontrolnih (15 signala) i 9 aluminijumom tretiranih pacova (20 signala) u dozi 2mg/kg: Srednja vrednost relativne spektralne snage (%) +/- standardna devijacija.



Slika 9. Relativna promena spektralne snage po frekventnim područjima za mali mozak u 9 kontrolnih (15 signala) i 9 aluminijumom tretiranih pacova (16 signala) u dozi (2mg/kg): Srednja vrednost relativne spektralne snage (%) +/- standardna devijacija.

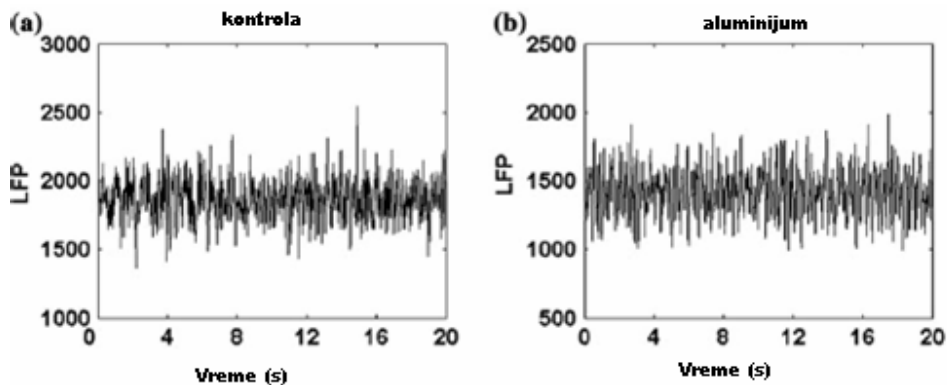
Tabela 1. Rezultati t-testa: relativna promena spektralne snage po frekventnim područjima za veliki i mali mozak, kontrola vs. tretman aluminijumom (2mg/kg).

p vrednost	delta	teta	sigma	beta	gama
Veliki mozak	0.0016	0.4913	0.0002	0.0072	< 0.0001
Mali mozak	0.0075	0.1624	0.0378	0.0246	< 0.0001

U tabeli su dati rezultati t-testa dobijeni poređenjem aluminijumom tretiranih i kontrolnih pacova. Procenat povećanja relativne spektralne snage usled efekta anestezije u modelu neurotoksičnosti u delta opsegu u odnosu na fiziološku kontrolu je različit kod velikog i malog mozga. Naime usled inhibicije i odsustva senzomotornih funkcija može se govoriti o spontanoj aktivnosti neurona kore velikog i malog mozga u anesteziranom stanju.

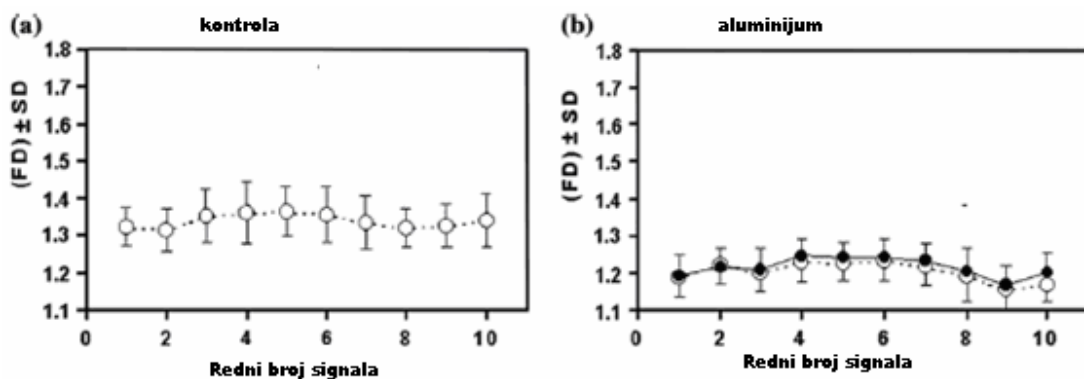
5.2. Fraktalna analiza električne aktivnosti velikog i malog mozga pacova u kontrolnim uslovima i posle tretiranja aluminijumom

Vrednosti fraktalne dimenzije su prikazane radi ilustracije kod kontrolnog pacova K4D i pacova A2P tretiranog sa 2mg/kg aluminijuma intraperitonealno. Na slici 10 predstavljena je ECoG aktivnost kore za tipičan slučaj intoksikacije aluminijumom koji podrazumeva promenu u neurotransmiterskoj aktivnosti, bez nakupljanja aluminijuma i stresa. Pacov je tretiran sa 2mg/kg aluminijuma dnevno intraperitonealno. Pri ovoj dozi ispoljavaju se svi simptomi toksičnosti, ali u najmanjoj meri.



Slika 10. Aktivnost kore velikog mozga u vremenskom domenu kod kontrolne i aluminijumom (2mg/kg Al i.p.) tretirane životinje.

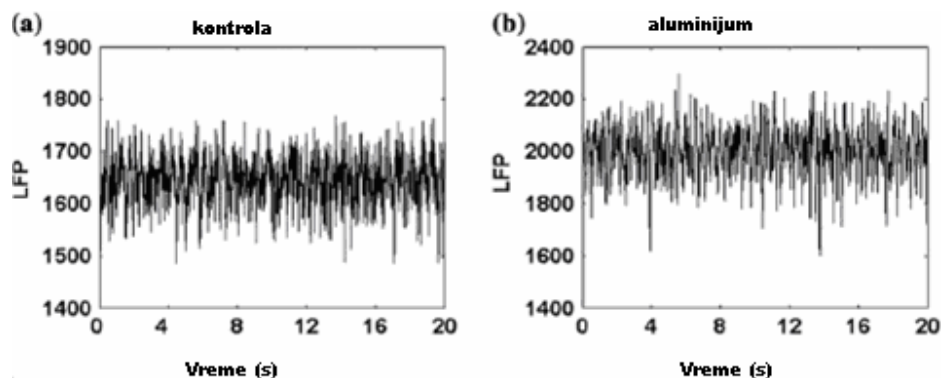
Na slici 11a prikazana je aktivnost leve hemisfere velikog mozga kontrolnog pacova, a na slici 11c odgovarajuće vrednosti fraktalne dimenzije u vremenskom domenu. Na slici 11b prikazana je aktivnost leve hemisfere velikog mozga aluminijumom tretiranog pacova, sa pripadajućim vrednosti fraktalne dimenzije (slika 11d). Može se smatrati da u uslovima toksičnosti dolazi do smanjenja fraktalne dimenzije (slika 11).



Slika 11. Srednje vrednosti fraktalne dimenzije i standardna devijacija za 10 epoha signala – kontrolna (a) i aluminijumom (2mg/kg) tretirana životinja (b) - veliki mozak.

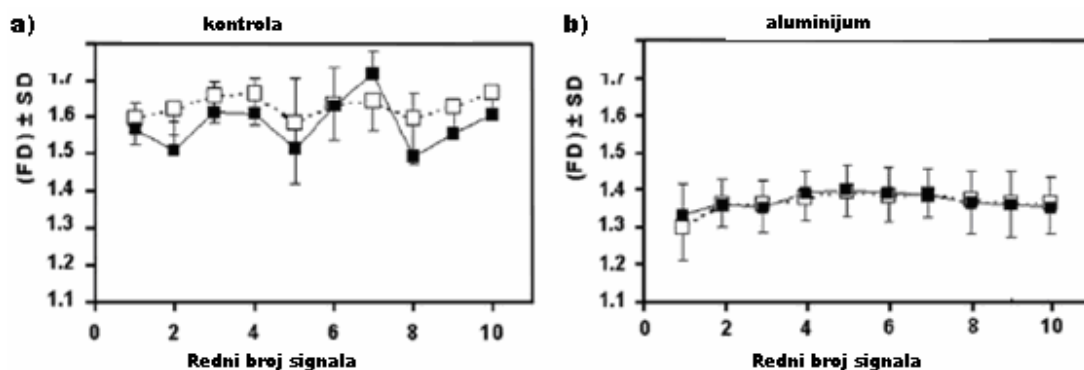
Pod istim uslovima registrovana je i aktivnost kore malog mozga (slika 12). Za razliku od velikog mali mozak ima veću plastičnost neuronske mreže pa je smanjenje fraktalne

dimenzije nešto manje. Posmatrano u odnosu na kontrolnu životinju smanjenje fraktalne dimenzije je merilo intoksikacije malog mozga (slika 13).



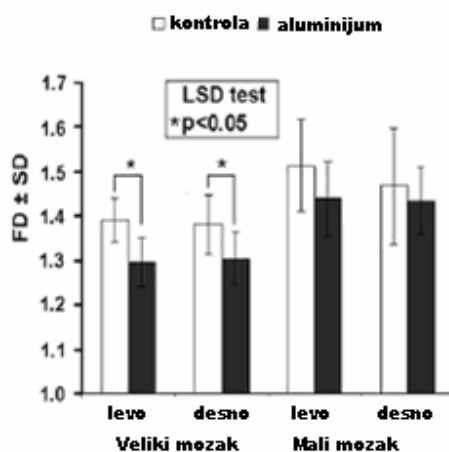
Slika 12. Aktivnost kore malog mozga levo u vremenskom domenu kod kontrolne i aluminijumom (2mg/kg) tretirane životinje.

Na slici 13 predstavljena je aktivnost kore malog mozga i vidi se da u kontrolnim uslovima postoji varijabilnost vrednosti fraktalne dimenzije i razlika između aktivnosti leve i desne hemisfere što je izraz plastičnosti i konektivnosti lokalnih mreža kore malog mozga. Međutim, ova osobina se delimično gubi u uslovima intoksikacije aluminijumom što je ilustrovano vrednostima fraktalne dimenzije na slici 13. Došlo je do stabilne promene fraktalne dimenzije u vremenu što ukazuje na to da trovanje aluminijumom utiče i na funkcionalnu aktivnost kore malog mozga.



Slika 13. Srednje vrednosti fraktalne dimenzije i standardna devijacija za 10 epoha signala – kontrolna (a) i aluminijumom (2mg/kg) tretirana životinja (b) - mali mozak.

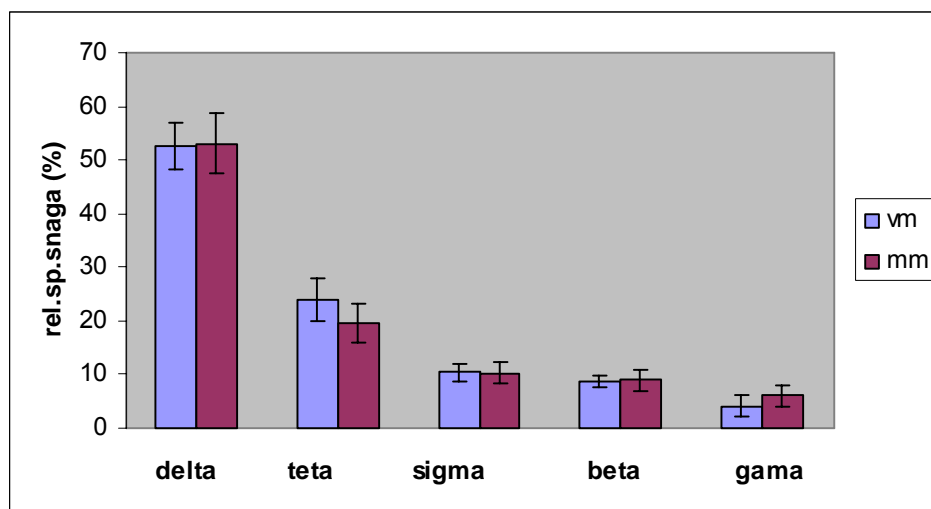
Dvofaktorski ANOVA test je pokazao da postoji razlika između kontrolnih (n=10) i tretiranih pacova (n=10) i da je aluminijum jedan od značajnih faktora ($p < 0,01$). Drugi faktor sa četiri nivoa je struktura mozga (veliki mozak levo i desno, mali mozak levo i desno). Statističkom analizom razlika u srednjim FD vrednostima aktivnosti leve i desne hemisfere velikog mozga u grupi aluminijumom tretiranih (2mg/kg) pacova nije dokazana razlika između grupa iako u kontrolnim uslovima može postojati asimetrična aktivnost leve i desne hemisfere velikog mozga. LSD test ukazuje na postojanje razlike između leve i desne hemisfere velikog mozga (kontrola u odnosu na tretman) što je u vezi sa razlikama u nakupljanju aluminijuma. Uočavaju se razlike u srednjim vrednostima fraktalne dimenzije između leve ($p < 0,05$) i desne ($p < 0,05$) hemisfere velikog mozga (posmatrana je srednja vrednost FD kontrole prema FD tretirane grupe za veliki mozak levo ili isto to za veliki mozak desno). Takođe, smer promene je ka smanjenju fraktalne dimenzije kod tretiranih pacova u odnosu na kontrolnu grupu. Na osnovu rezultata se može zaključiti da su veliki i mali mozak, iako reaguju sličnim mehanizmima, funkcionalno različito osetljivi na intoksikaciju. Smanjenje fraktalne dimenzije ECoG aktivnosti kore velikog i malog mozga može se smatrati posledicom neurotoksičnosti i ono je srazmerno kod obe strukture (slika 14).



Slika 14. Poređenje vrednosti FD kore velikog i malog mozga u grupi od 10 kontrolnih i 10 aluminijumom (2mg/kg) tretiranih pacova - srednja vrednost i standardna devijacija.

5.3. Dozni efekat tretmana aluminijumom na ECoG aktivnost

U dizajnu eksperimenta varirani su uslovi aplikacije, kao i doza aluminijuma. Posmatrana je grupa pacova intraperitonealno tretiranih aluminijumom u dozi od 2, 4 ili 6 mg/kg. Poređena je ECoG aktivnost velikog mozga aluminijumom tretiranih pacova u odnosu na aktivnost malog mozga. Na slici 15 su prikazane srednje vrednosti relativne spektralne snage neuronske aktivnosti 15 pacova (15 signala) tretiranih aluminijumom u dozama 2-6 mg/kg. Nije dokazana statistički značajna razlika u aktivnosti velikog i malog mozga po frekventnim opsezima. To ukazuje da toksičnost aluminijuma ima isti efekat na pojedine moždane strukture.



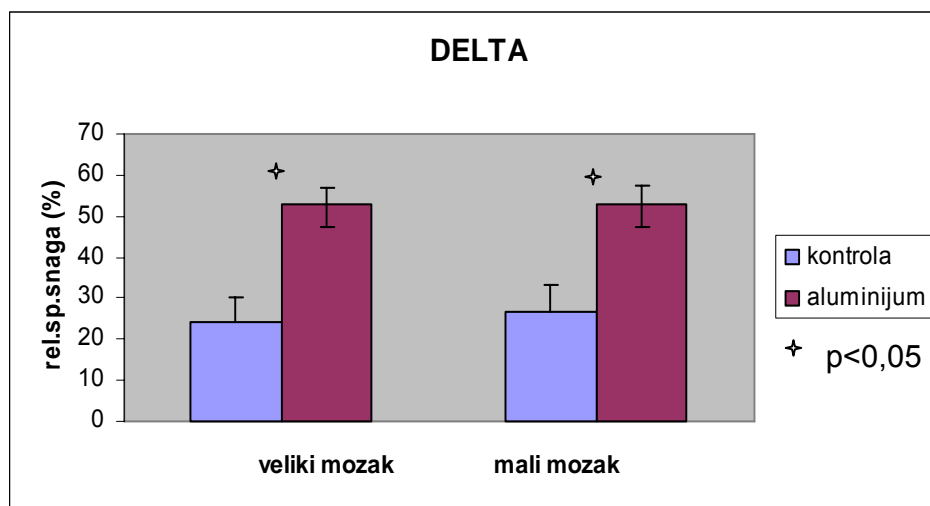
Slika 15. Srednje vrednosti relativne spektralne snage u grupi od 15 pacova intraperitonealno tretiranih aluminijumom u dozama 2-6mg/kg i standardna devijacija - aktivnost velikog (vm) i malog mozga (mm) po frekventnim opsezima.

Tabela 2. Rezultati U testa: relativna promena spektralne snage po frekventnim područjima za veliki i mali mozak (15 pacova).

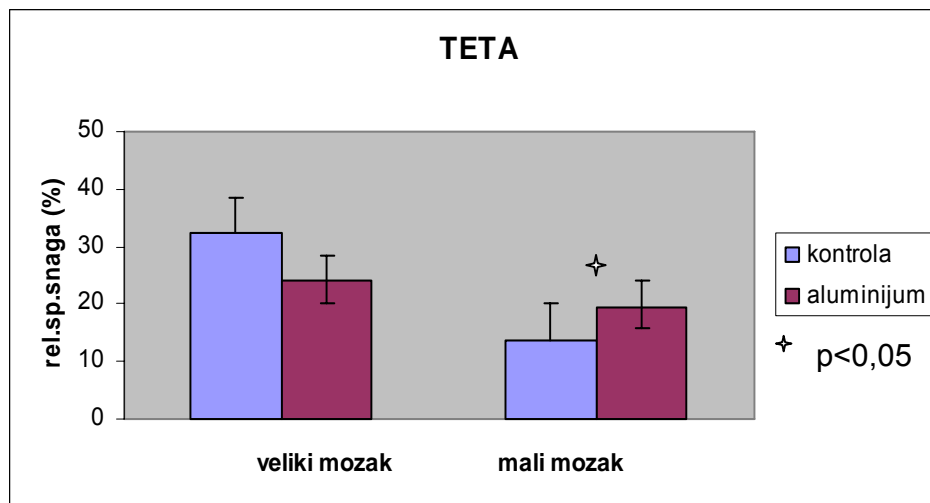
p vrednost	delta	teta	sigma	beta	gama
vm/mm	0.78	0.18	0.72	0.98	0.11

Rezultati U testa ukazuju da neurotoksičnost ima isti efekat na različite strukture i da nepostoji razlika između velikog i malog mozga.

Promene aktivnosti mozga manifestuju se promenama u delta i teta opsegu. Povećanje aktivnosti u delta opsegu može se smatrati indikatorom neurotoksičnosti. Takođe promena u teta opsegu je srazmerna veličini promene aktivnosti mozga usled intoksikacije iako je ona varijabilna usled dejstva anestezije. Na slici 16 i 17 pokazana je promena u grupi od 15 pacova intraperitonealno tretiranih aluminijumom u dozi 2-6 mg/kg. Ovakva promena opisuje aktivnost neurona mreže u uslovima intoksikacije.



Slika 16. Relativna spektralna snaga \pm SD delta frekventnog opsega u grupi od 15 pacova tretiranih intraperitonealno dozom od 2-6mg/kg aluminijumom u odnosu na kontrolu



Slika 17. Relativna spektralna snaga teta frekventnog opsega \pm SD u grupi od 15 pacova tretiranih intraperitonealno dozom od 2-6mg/kg aluminijumom u odnosu na kontrolu

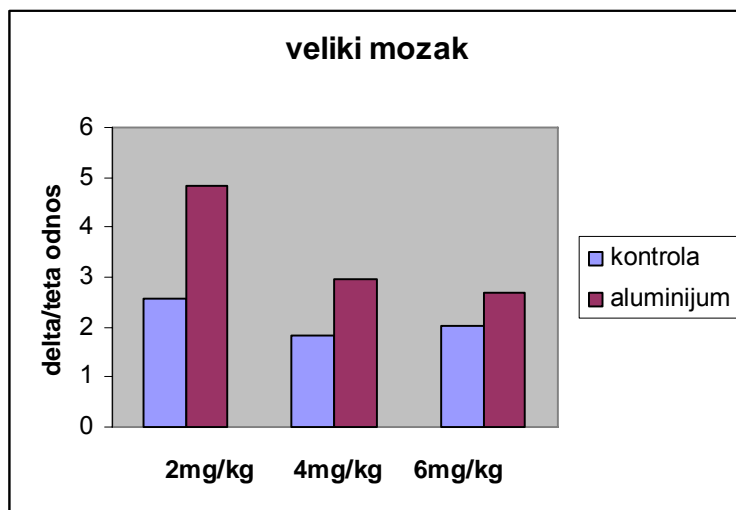
Statistička analiza Man –Vitnijevim testom je pokazala značajne promene u delta i teta ritmu u grupi pacova intraperitonealno tretiranih aluminijumom (2-6mg/kg) u odnosu na fiziološku kontrolu (slika 16 i 17). Rezultati testa prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3. Rezultati U testa-statistička značajnost promene aktivnosti u delta i teta opsegu na velikom i malom mozgu

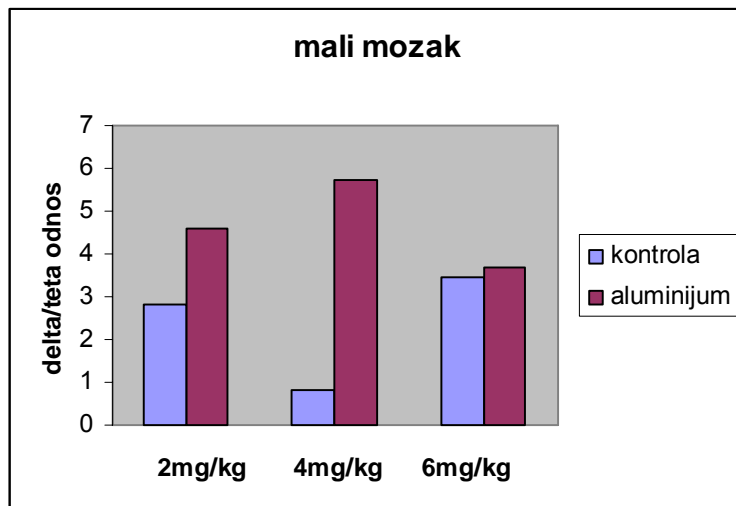
p vrednost	delta	teta
vm/k	0.009	0.075
mm/k	0.028	0.028

Za procenu efekta neurotoksičnosti posmatran je odnos δ i θ opsega registrovanog spektra kontrolne i aluminijumom tretirane grupe pacova. U kontrolnoj grupi i grupi tretiranih pacova posmatrarni su signali koji podrazumevaju stabilne uslove anestezije tj. u grupi tretiranih pacova ispoljavaju znake toksičnosti tipične za stanje promene neurotransmitterske aktivnosti i akumulacije aluminijuma bez sekundarnog efekta stresa. Na taj način su izabrani kriterijumi na osnovu kojih je moguće vršiti proračune u grupi pri

određenoj dozi aluminijuma. Pošto sa porastom doze aluminijuma dolazi do ispoljavanja i efekta stresa kontrolne životinje su birane tako da anestezija kompenzuje stres a da je njen uticaj na neurotoksičnost aluminijuma kvalitativno isti. Kontrolne grupe su birane za tri različita uslova anestezije: 35mg/kg, 45mg/kg i 60mg/kg. Na taj način posmatrana grupa tretiranih pacova podrazumeva u odnosu na fiziološku kontrolu isti tip promene aktivnosti neurona u stabilnom stanju intoksikacije.



Slika 18. Efekat neurotoksičnosti pri različitim dozama aluminijuma (2, 4, 6 mg/kg Al) u odnosu na kontrolnu grupu (35, 45 ili 60 mg/kg anestetika) - veliki mozak



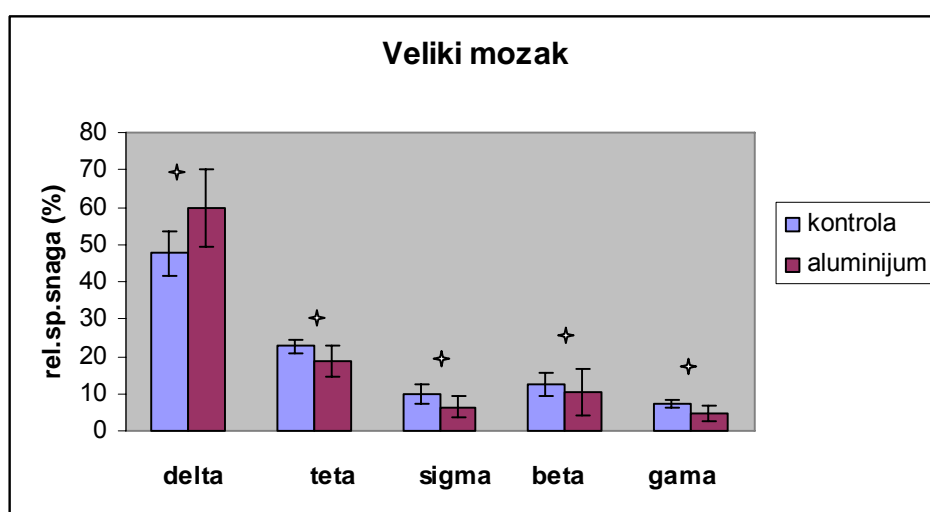
Slika 19. Efekat neurotoksičnosti pri različitim dozama aluminijuma (2, 4, 6 mg/kg Al) u odnosu na kontrolnu grupu (35, 45 ili 60 mg/kg anestetika) - mali mozak

Posmatrano po grupama uočava se da intoksikacija aluminijumom menja odnos δ/θ opsega i kod velikog i malog mozga. Promena odnosa delta/teta opsega je takođe statistički značajna kako na velikom ($p=0,0016$) tako i na malom mozgu ($p=0,0199$) u grupi od 15 pacova tretiranih intraperitonealno dozom od 2-6 mg/kg aluminijuma u odnosu na kontrolu.

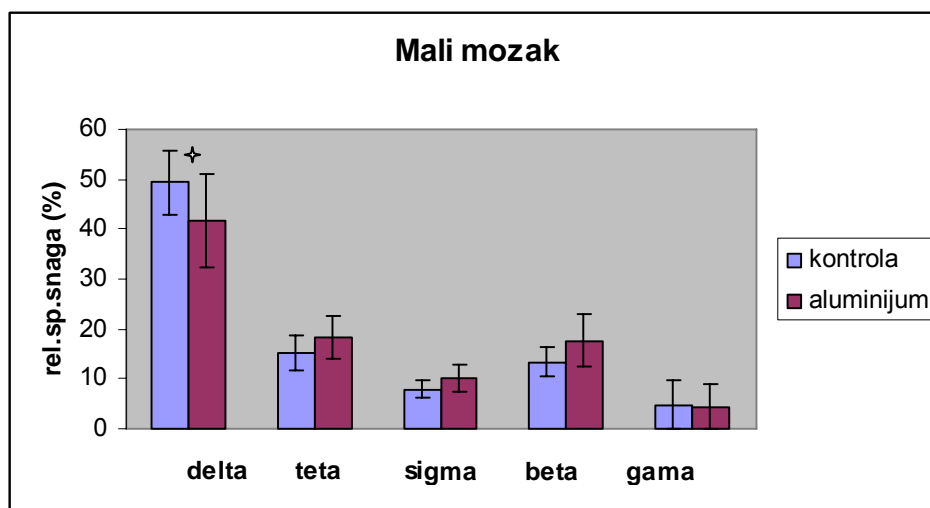
U grupi aluminijumom tretiranih pacova za svaku jedinku u eksperimentu računata je vrednost odnosa relativne spektralne snage u delta i teta opsegu. U zavisnosti od fiziološkog stanja moguća su tri odgovora: delta raste a teta opada, delta i teta raste i delta opada a teta raste. U grupi registrovanih jedinki posmatrana je minimalna, srednja i maksimalna vrednost delta i teta opsega i rezultat predstavlja srednju vrednost ove tri vrednosti. Vidi se da su promene na velikom i malom mozgu drugačijeg tipa kao i da sa povećanjem doze postoji tendencija smanjenja vrednosti odnosa delta i teta opsega na velikom mozgu, dok na malom mozgu promena nije monotona. Ova promena odgovara dejstvu aluminijuma na neurotransmittersku aktivnost, citotoksičnost i akumulaciju aluminijuma u nervnom tkivu.

5.4. Sekundarni efekat kod mladunaca izloženih aluminijumu u gestacionom i laktacionom periodu

U eksperimentu su korišćeni i ženke pacovi soja Wistar i Sprague Dawley. Životinje su u toku trudnoće pile 1,5% rastvor aluminijuma. Mladunci ovih pacova korišćeni su dalje u eksperimentu i registrovani su njihovi ECoG. Ovaj eksperimentalni dizajn je predložen da bi se analiziralo eventualno toksično dejstvo aluminijuma na mladunce, a bez sporednog efekta stresa, akumulacije u tkivima i narušavanja krvno-moždane barijere koje je prisutno kod intraperitonealne aplikacije aluminijuma. Drugi razlog korišćenja mladunaca u eksperimentu je da se uoče mehanizmi plastičnosti i adaptabilnosti nervnog sistema koji po pravilu kod starijih jedinki nisu u toj meri izraženi.



Slika 20. Srednja vrednost relativne spektralne snage velikog mozga po frekventnim oblastima +/- standardna devijacija kod 10 kontrolnih i 10 mladunaca čije su majke u trudnoći i laktaciji tretirane aluminijumom (1,5% rastvor Al).



Slika 21. Srednja vrednost relativne spektralne snage malog mozga po frekventnim oblastima +/- standardna devijacija kod 10 kontrolnih i 10 mladunaca čije su majke u trudnoći i laktaciji tretirane aluminijumom (1,5% rastvor Al).

Na slikama 20 i 21 je prikazana aktivnost grupe neurona velikog i malog mozga u grupi od po 10 mladunaca pacova. Man-Vitni testom (Tabela 4)pokazano je da tretman aluminijumom dovodi do promena u svim frekventnim opsezima ($p < 0.05$) na velikom mozgu. To ukazuje da iako su molekularni mehanizmi toksičnosti isti postoji razlika u funkcionalnoj aktivnosti grupe neurona kod određenih struktura. Na malom mozgu se ispoljava kao povećanje delta ritma.

Tabela 4. Rezultati Man-Vitni testa (10 mladunaca)-veliki i mali mozak

p vrednost	delta	teta	sigma	beta	gama
veliki mozak	0.012	0.006	0.012	0.041	0.01
mali mozak	0.033	0.096	0.226	0.131	0.112

Odnos delta i teta opsega ukazuje na postojanje promene kod materinski tretiranih pacova i do 50 %. Ovakva promena može se smatrati indikatorom intoksikacije pošto je odnos delta i teta aktivnosti različit od odnosa delta/teta kod odraslih pacova sa obzirom da je trovanje sekundarno izazvano.

Tabela 5. Rezultati ANOVA testa - odnos delta/teta ritma kod mladunaca tretiranih aluminijumom i kontrolne grupe.

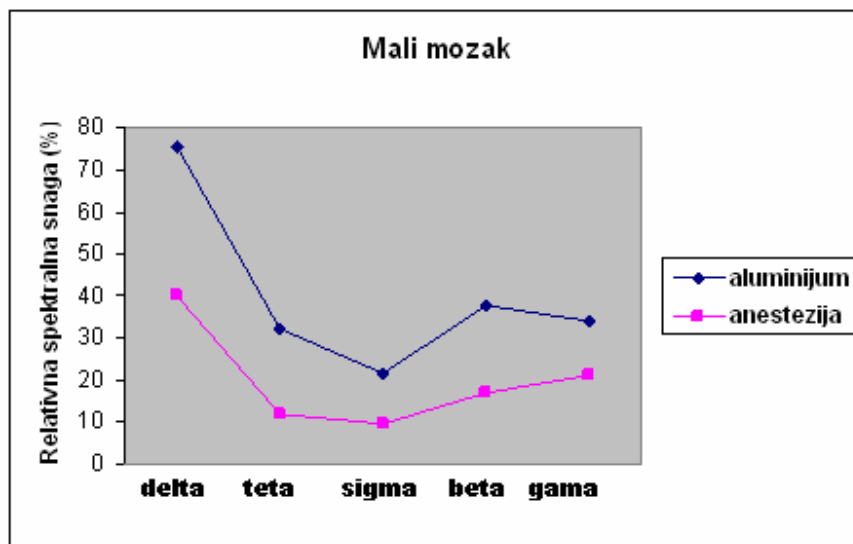
Odnos relativne spektralne snage δ i θ opsega	Srednja vrednost	Standardna devijacija	df	F	p
Kontrola	2,13	0,391	1	13,58	0,002
Tretman aluminijumom	3,348	0,969			

Ovim jednofaktorskim ANOVA testom testiran je efekat toksičnosti (delta/teta odnos) u modelu intoksikacije aluminijumom u grupi od 10 mladunaca čime je obuhvaćena individualna i grupna varijabilnost i pokazan je sumarni efekat promene aktivnosti preko odnosa δ/θ ritma. Testirana je promena odnosa δ/θ ritma koja podrazumeva i promenu usled toksičnosti i prilagodljivost na uslove toksičnosti. Sama promena odnosa može imati tri odgovora porast delta, a smanjenje teta ritma ili porast oba ritma ili smanjenje delta, a povećanje teta ritma. Sve ove promene su izraz toksičnosti i ne mogu se odvojeno posmatrati. U embrionalnom razviću neurotoksičan efekat se ispoljava u δ i θ opsegu. Relativno povećanje snage u δ opsegu je praćeno smanjenjem spektralne snage u θ opsegu i nema promena u višim frekventnim opsezima. Smanjenje δ ritma u ovom kontekstu je adaptivni mehanizam kojim se mladunac prilagođava uslovima izmenjene homeostaze usled toksičnosti.

5.5. Spontana aktivnost malog mozga i njegova uloga u neurotoksičnosti

U eksperimentima je istovremeno registrovana aktivnost parijetalne kore velikog mozga kao i kore malog mozga. Osnovni smisao toga je da se uporedi njihova spontana aktivnost jer se registrovanje vrši pod anestezijom. Po pravilu veliki mozak je osjetljiviji na promene dok mali ispoljava i adaptabilnu sposobnost kompenzacije, a ujedno ima ulogu i u reparaciji oštećene funkcije - plastičnost. Uloga malog mozga u adaptabilnosti i plastičnosti predstavljena je preko spontane aktivnosti u odsustvu stimulusa i viših funkcionalnih veza.

Na slici 22 je prikazana promena relativne spektralne snage po frekventnim opsezima. Obe grupe su registrovane pod anestezijom te podrazumevaju stanje odsustva senzomotornih reakcija. Kontrolna grupa od 10 pacova birana je za uslove stabilne anestezije sa manjom promenom delta ritma. Tretirana grupa je predstavljena srednjom vrednosti u grupi od 10 odraslih pacova (1,5% rastvor Al) koji su ispoljili znake toksičnosti.



Slika 22. Srednja relativna spektralna snaga malog mozga kod 10 pacova pod anestezijom i 10 pacova tretiranih aluminijumom (1,5% rastvor Al).

Vidi se da postoji slična raspodela relativne spektralne snage po frekventnim opsezima kod prve i druge grupe životinja. Može se zaključiti da spontana aktivnost kore u uslovima anestezije i neurotoksičnosti podrazumeva iste raspodelu relativne spektralne snage ali postoje dva različita stanja adaptacije.

6. DISKUSIJA

Aluminijum je široko rasprostranjen element u prirodi i istraživanja su ukazala na njegov toksičan efekat i korelaciju sa mnogim bolestima kao što je Alchajmerova bolest, Multipleks skleroza i Parkinsonizam (Campbell A., 2000; Kawahara M., 2005). U ovoj studiji istraživani su neurotoksični efekat aluminijuma u animalnom modelu i pokazana je veza između toksičnih efekata aluminijuma na mozak i neuronske aktivnosti. Promena relativne spektralne snage u delta opsegu jednim delom je uslovljena toksičnošću aluminijuma. Promene aktivnosti neurona kore koje su posledica dejstva aluminijuma podrazumevaju više molekularno-bioloških mehanizama i fizioloških procesa.

Intoksikacija aluminijumom pokazuje selektivni efekat na pojedine organe i tkiva. Neurološka manifestacija intoksikacije je u vezi sa stresom, oksidativnim promenama i narušavanjem homeostaze krvno-moždane barijere (Verstaeten SV., 2008). Pokazano je da intoksikacija i nakupljanje aluminijuma u mozgu imaju višestruk efekat određen selektivnošću tkiva, vezama u mozgu i dozom intoksikacije (Nayak P., 2001). Animalni model je postavljen tako da kvalitativno i kvantitativno opiše preko moždanog zapisa patofiziološko stanje u uslovima varijacije ove tri komponente. Animalni model je ukazao da je neurodegenerativni tip promene direktan adaptabilni odgovor na patofiziološko stanje intoksikacije. Sličnost sa bolestima u humanoj populaciji je direktna posledica narušavanja jonske homeostaze u mozgu i podrazumeva promenu na molekularnom i na neurofiziološkom nivou (Nayak P., 2001). Efekti toksičnosti su relativni i variranjem doze i eksperimentalnih uslova pokazali su zavisnost od doze kao i kumulativni efekat.

Opis stanja toksičnosti i fiziološki aspekt predstavljeni su spektralnom i fraktalnom analizom. Sa obzirom na stanje u humanoj populaciji molekularni mehanizmi intoksikacije aluminijumom su predmet intenzivnih proučavanja (Nayak P., 2002). Intoksikacija aluminijumom je vršena intraperitonealno i putem vode za piće da bi se stekao uvid u metaboličko stanje i postigao minimalni toksični efekat. Tretirane su odrasle jedinke, ali i majke u trudnoći i laktaciji kako bi se odredila individualna osetljivost na intoksikaciju.

Prema rezultatima moguće je zaključiti da aluminijum ima neurotoksično dejstvo koje je selektivno adaptivno-kompenzaciono. To znači da postoje mehanizmi plastičnosti nervnog sistema koji teže da restituišu narušenu jonsku homeostazu, a odgovor na nakupljanje aluminijuma ima adaptabilni odgovor. Pokazano je da intraperitonealna aplikacija ima toksičan efekat koji pogađa različita tkiva, a mahom jetru i mozak (Julka D., 1996), kao i da neurointoksikacija u vezi sa oksidativnim stresom, produkcijom slobodnih radikala i oštećenjem propustljivosti krvno - moždane barijere. Primećeno je da starije jedinke imaju veću osetljivost na intoksikaciju sa obzirom na procese starenja koji sinergistički deluju na osetljivost moždanog tkiva, kao i da mehanizmi neurološke konekcije sa višim centrima u uslovima intoksikacije bivaju narušeni. Pokazano je da između mladih i starijih jedinki postoje razlike u nervnoj aktivnosti i u istim eksperimentalnim uslovima. Intoksikacija putem vode za piće ima kumulativan efekat i po pravilu pacovi u periodu laktacije su najosetljiviji sa obzirom na neurohumoralni odgovor, dok kod starijih jedinki metabolički procesi deluju na eliminaciju aluminijuma iz tkiva.

Efekat dozne zavisnosti posmatran je u toku trudnoće, gestacije, laktacije, kao i kod odraslih pacova i kod starijih jedinki (WHO, 1997). Sumarno doza od 2 mg/kg tkiva ima minimalan neurotoksični efekat (Tabela 1). Aluminijum pri ovoj dozi deluje selektivno na neurotransmisiju glutamata i stimuliše aktivnost GABA, a ujedno je pomerena homeostatska jonska ravnoteža, dok pri višim dozama dolazi i do nakupljanja aluminijuma u nervnom tkivu (ATSDR, 1992). Ranije studije pokazale su promene u ponašanju i holinergičku promenu u transmisiji (Connor DJ., 1988). Aplikacija aluminijuma u trudnoći ima neurohumoralni odgovor i izaziva mononukleozu kod osetljivih tipova. U stadijumu gestacije odgovor je teratogen (Colomina MT., 1992, 1994) i deluje na smanjenje kognitivnih sposobnosti. Najizraženiji adaptabilni tip pokazuje intoksikacija u periodu laktacije koja pokazuje da motorni mehanizmi mogu dovesti do smanjenja neurotoksičnosti, kao i da sinaptogeneza deluje na mestima nakupljanja aluminijuma. Kod odraslih jedinki smanjena je adaptabilnost i plastičnost dok apoptotski mehanizmi deluju na ćelije sa aluminijumom, te ovakav odgovor kod adulta može dovesti do inflamacije ili neurodegeneracije. Kod starijih jedinki nisu aktivirani mehanizmi adaptabilnosti i

plastičnosti već intoksikacija ima efekat na funkciju celog mozga, a jedino metabolički procesi teže eliminaciji aluminijuma što ima za posledicu nakupljanja aluminijuma u pojedinim tkivima (srce, jetra, pluća), te intoksikacija pogađa ceo organizam. Iz ovog se zaključuje da aluminijum deluje teratogeno, toksično i neurodegenerativno. Ovakav efekat aluminijuma ranije je opisan promenama u ponašanju (Commissaris RL., 1982). Efekat intoksikacije može biti akutnog ili hroničnog tipa u zavisnosti od trajanja, vrste intoksikacije i starosti (Connor DJ., 1988).

Prvi problem koji se postavlja je da se odredi prag neurotoksičnosti (WHO, 1997). Razlike u ponašanju i uloga oksidativnog stresa su primarni indikatori neurotoksičnosti (Kumar V., 2009). S obzirom na eksperimentalni model postoje varijacije u okviru grupa tretiranih različitim dozama aluminijuma. Ove varijacije su izraz plastičnosti nervnog tkiva mozga, osetljivosti jedinke i akumulativnog dejstva aluminijuma. S obzirom na to određivan je efekat neurotoksičnosti na neurotransmisiju. Pri dozi od 2mg/kg sve životinje su ispoljile znake toksičnosti i može se smatrati optimalnom najmanjom efektivnom dozom (Slika 8 i 9). Pri ovoj dozi javljaju se ireverzibilne promene u nervnoj kondukciji. Manje doze pogađaju druga tkiva i metabolišu se, te je tip odgovora nervnog sistema u promeni senzo-motorne regulacije (Schroeder MA.,1975). Na Slici 21 i 22 opisana je spontana aktivnost kore u uslovima anestezije i intoksikacije. Već pri višim dozama javljaju se promene nervnog tkiva u vezi sa nakupljanjem aluminijuma koje imaju za posledicu promenu konduktivnosti, neurodegeneraciju i apoptozu (Bharathi P., 2008). Ove promene postižu zasićenje pri dozi od 4 mg/kg. Pri višim dozama neurotoksični efekat zadobija hronični oblik i ima patofiziološki odgovor organizma.

Aplikovan aluminijum ima više efekata na organizam: pogađa lokalno tkivo, metabolički se transformiše i akumulira se u pojedinim organima (WHO, 1997). Prema podacima iz literature postoje velike fluktuacije u primenjivanoj dozi (Colomina MT., 1994; Domingo JL., 1987). Za 2-2,5 meseca stare jedinke tretirane različitim dozama aluminijuma, definisali smo da doza od 50-200 mg/kg dnevno ima neurotoksičan efekat i za posledicu patoneurološku sliku mozga (Martać Lj., 2006). Senzibilnost jedinke je korelisana sa starosnim tipovima, te je pokazano (Martać Lj., 2010) da je period laktacije i

gestacije najosetljiviji i pokazuje malformacije dok je nakupljanje aluminijuma naizraženije u starosti.

Definisanje neurotoksičnosti preko neurotransmitterske aktivnosti se zasniva na najizraženijim promenama u glutamatergičkoj transmisiji kao i na promenama na mestima nakupljanja aluminijuma koje su vrlo varijabilne i mesto specifične (Ros J., 2001). Selektivnost velikog i malog mozga na aluminijumsku neurotoksičnost je različita (Keković G., 2010). U juvenilnom periodu determinaciju razvića viših funkcija vrši mali mozak koji je u ovom periodu osetljiviji na trovanje. Kod adulta mali mozak može da kompenzuje blagu toksičnost preko lokalnih malomoždanih kola i jedara te ima visok adaptabilni potencijal (Mosthaghie A., 1999). Ovakva uloga malog mozga sa starošću se smanjuje i sadestvuje sa oštećenjem veza u višim centrima u velikom mozgu. Osetljivost velikog mozga na intoksikaciju aluminijumom je veća i po pravilu nakupljanje aluminijuma u mozgu ima za posledicu oštećenje funkcije (Keković G., 2010). Suprotna hemisfera može preuzeti ulogu regulatora, ali zbog oštećenja mreže restitucija je u uslovima neurotoksičnosti ograničena i izmenjena. Sa obzirom na regulatornu funkciju intoksikacija aluminijumom po pravilu više pogađa veliki mozak kod odraslih jedinki, dok kod starijih dolazi do intenzivnog nakupljanja aluminijuma i inflamacije tkiva.

U modelu aluminijumske neurotoksičnosti kao indikator promene posmatran je delta ritam registrovanog spektra moždane aktivnosti pacova koji je u korelaciji sa svim napred navedenim promenama. To je postignuto variranjem doze anestetika i održavanjem u stanju suprimacije bola (Ćulić M., 2001). U ovom modelu sigma opseg registrovanog spektra moždane aktivnosti pacova odgovara alfa ritmu kod ljudi, koji obuhvata kognitivno-intelektualne sposobnosti (Ćulić M., 2007), dok se beta ritam odnosi na motorne sposobnosti (Ćulić M., 2003). Gama ritam po pravilu je posmatran u skladu sa prethodno razvijenim modelom lezije tkiva prilikom registrovanja (Ćulić M., 2002; Kalauzi A., 2002).

Može se zaključiti da promena sigma ritma ima patološki karakter neurotoksične promene, dok su sve manje promene kompenzaciono-reverzibilnog tipa. Naravno da pri tome treba imati u vidu da su promene funkcije prisutne kao plastičnost koja se smanjuje

linearno sa starošću (Ćulić M., 2005). Promene delta ritma od 5 % nisu posledica toksičnog efekta jer se aluminijum eliminiše metabolički (Grbić G., 2006). Sve promene iznad 5 % su rezultat neurotoksičnosti i selektivno pogađaju tkiva i funkcije dok su promene iznad 9 % su neurodegenerativnog tipa (Ćulić M., 2007).

Oscilatorna promena delta ritma je karakteristična za animalni model intoksikacije pacova (Papp A., 2005), ali je u korelaciji i sa humanim tipom za mali mozak, dok više psihičke funkcije kod ljudi zahtevaju dopunske analize i pokazuju veliku osetljivost na intoksikaciju. Delta ritam ili sporotalasne komponente od 0,1-4 Hz variraju u različitim patološkim i fiziološkim stanjima. Sama anestezija uvećava delta snagu te su podaci posmatrani za definisano stanje anestezije pri kojoj je izvršena suprimacija bola i neutralisana je motorna kretanja i pokreti (Ćulić M., 2003). Povećanje delta ritma može biti posledica više faktora (Miu A., 2003), kao što su stres, oštećenje krvno-moždane barijere, neurotransmittersku modulacija, inflamacija i neurodegeneracija (Čapo I., 2007). Svi ovi parametri su varijabilni i u različitoj meri doprinose povećanju relativne spektralne snage u delta opsegu.

Za razliku od velikog mozga kod malog mozga je posmatran delta/teta odnos s obzirom na stanje malomoždane neuralne mreže koja ima spontanu aktivnost obrade senzomotornih informacija (Keković G., 2010). Rezultati dobijeni za mali mozak sa obzirom na senzibilnost i selektivnost malog mozga ukazuju na stepen oštećenja neuronske mreže u uslovima intoksikacije (Martać Lj., 2006). Promena odnosa delta/teta ritma u uslovima neurotoksičnosti je izraz efekta aluminijuma na aktivnost neurona, neurotransmisije i promena u konduktivnosti nervne mreže (Martać Lj., 2010). Sve promene odnosa delta/teta ritma veće od 20 % ukazuju na postojanje ireverzibilne reakcije pa se mogu dovesti u vezu sa intoksikacijom aluminijumom (Binienda Z., 2011). Manje promene imaju za posledicu aktivaciju molekularnih mehanizama koji determinišu sintezu, oslobađanje i receptorsku aktivaciju neurona, dok srednje promene se odnose i na stanje jonske homeostaze u nervnim putevima.

Povećanje delta ritma u uslovima intoksikacije aluminijumom može biti indikator stepena promena. Dijagnostički se diferenciraju tri patofiziološka stanja: prvo je vezano za promene u aktivnosti neurona zasnovane na molekularnom nivou, drugo je vezano za neurotransmittersko-jonsku promenu funkcije, treće je u vezi sa nakupljanjem aluminijuma i neuroinflamacijom. Ova tri stanja zahtevaju različit medikamentni tretman. Ova tri stanja mogu se kvantifikovati fraktalnom dimenzijom koja ukazuje na linearnu promenu u stepenu oštećenja (Keković G., 2010).

Studija je rađena i na mladuncima koji su u gestacionom i laktacionom periodu bili tretirani aluminijumom (Martać Lj., 2010). S obzirom na to posmatrana je promena delta aktivnosti kao izraz dozno-zavisnog stepena toksičnosti kao i promena teta ritma usled razvoja adaptacija i plastičnosti neronske mreže (Slika 20 i 21). Promene u višim opsezima (gama ritam) su izraz lezije i regeneracije usled eksperimentalne procedure i nisu u vezi sa toksičnošću.

Mehanizmi plastičnosti su posmatrani kod novorođenih mladunaca starih prosečno tri nedelje čije su majke u toku gestacije ili laktacije pile 1,5 % rastvor aluminijuma (Čapo I., 2008). Poređene su ove dve grupe sa obzirom na razlike u tretmanu. Kod prve grupe uočen je fetotoksičan i teratogeni efekat. Motorne sposobnosti ovih mladunaca su smanjene što ukazuje na ulogu malog mozga u razviću adaptacija. Kod druge grupe postoji humoralna neurotoksičnost koja pogađa neuroimuni odgovor. Kod ovih mladunaca mali mozak ima ulogu u regulaciji razvoja viših sposobnosti preko motornog učenja. Mali mozak ima dva tipa plastičnosti. Prvi je vezan za lokalna malomoždana kola a drugi se odnosi na projekcije ka drugim moždanim strukturama. Neurotransmitterski posmatrano intoksikacija je najizraženija u glutamatnoj transmisiji (Cucarella C., 1998), ali je u animalnom modelu elektrokortikalne registracije pod anestezijom ona potencirana dejstvom anestetika na inhibiciju GABA (Nayak P., 2001). Primena različitih anestetika (zoletil, nembutal) pokazuje da usled anestezije postoje fluktuacije u glutamatergičkoj transmisiji koja je u intoksikaciji povećana (El-Rahman S.S., 2003). Takođe teratogeni efekat je posledica preterane ekscitacije neurona putem glutamata pri smanjenoj metaboličkoj produkciji GABA. Ove promene se definišu povećanjem delta i smanjenjem teta ritma.

Postoje tri adaptabilna odgovora velikog mozga a to su: povećanje delta ritma bez promene teta ritma, povećanje delta uz smanjenje teta, delta bez promene i smanjenje teta ritma (Kesić S., 2006). Prvi se definiše kao neurotransmitterska toksičnost, drugi kao narušavanje funkcionalne povezanosti, a treći kao kompenzacija toksičnosti. Iz ovoga se može definisati maksimalna tolerantnost prema intoksikaciji (Martać Lj., 2006).

Kod adultnih tipova intoksikacija je praćena smanjenom apoptozom i neurodegeneracijom (Bharathi P., 2008). Usled nakupljanja aluminijuma u mozgu dolazi do oksidativnog stresa i inflamacije moždanog tkiva što za posledicu ima razvoj neurodegeneracije (Campbell A., 2010; Khumar V., 2010). Ovakav animalni model je komparabilan sa Alchajmerovom bolešću (Kawahara M., 2005).

Povećanje delta, a smanjenje alfa i beta spektralne snage imaju dijagnostički i prognostički značaj. Delta iznad 45 % opisuje oksidativni stres, inflamaciju i neurodegeneraciju, dok se alfa i beta ritmovi odnose na motorne obrasce ponašanja pacova, tj. na više psihičke, kognitivne i memorijske funkcije kod humanih pacijenata.

Predmet ove studije nije bila populaciona analiza mada je uočena adaptabilnost i selekcija malformativnih tipova. Proučavanje neurotoksičnosti primarno ima smisao u izučavanju patofizioloških promena, a sekundarno je u vezi sa promenom u ponašanju. Ovaj model preko efekta promene ima prognostički i dijagnostički značaj, jer ukazuje na minimalne i maksimalne efekte aplikacije aluminijuma kod jedinki. Dozni efekat pokazuje promenu u odnosu na količinu aluminijuma. Terapija stanja zatrovanosti bi zahtevala poznavanje molekularnih mehanizama koji leže u osnovi promene. Iako su predmet intenzivnih proučavanja, obrasci intoksikacije nisu još razjašnjeni.

Na osnovu literature dat je pregled promena izazvanih aplikacijom aluminijuma na animalnom modelu. Usled nakupljanja aluminijuma u moždanom tkivu narušava se Ca^{2+} homeostaza. Odgovor je produkcija glutamata u visokim koncentracijama koja pogađa postsinaptičke neurone. Kod hroničnog modela glutamatergička intoksikacija može imati i globalan efekat na nivou mozga (Choi DW., 1998). Povećana glutamatergička transmisija ima za posledice smrt ćelije i degeneraciju. Ovi efekti su prisutni u oboljenjima kao što je

olivopontocerebelarna atrofija, Huntingtonova bolest, epilepsija, hipoksija, ishemija i hipoglikemija (Greenamyre JT.,1986). Citotoksičnost glutamata zasniva se na njegovom produženom dejstvu na 4 tipa receptora NMDA, AMPA, kainatni i metabotropni (Hugon J.,1996). U animalnom modelu neurotoksičnost je izazvana stimulacijom metaboličke produkcije glutamata kao i njegovom saturacijom receptora. Ovakav efekat glutamata izaziva efekat na neurotransmisiju cele neuralne mreže, a javlja se pri dozi od 4 mg/kg aluminijuma dok pri manjim dozama dominira excitotoksičnost. Pokazano je na *in vivo* modelima da laktat redukuje glutamatergičku citotoksičnost (Ros J., 2001). Neurobiheviornalni testovi ukazuju na promene u sposobnosti motornog učenja usled oksidativnog stresa (Kumar V., 2009). Oksidativni stres ima za posledicu povećane peroksidazne aktivnosti, oksido-redukcione reakcijama i nakupljanje radikala i abervaciju mitohondrija kao i smanjenu produkciju ATP-a. Neurotoksičnost aluminijuma i neurodegenerativni procesi su izučavani u korelaciji sa Alzheimerovom bolešću (Bharathi P., 2008). Neurodegenerativni procesi su prisutni kod starijih jedinki. Aktivacija apoptoze prati neuralnu degeneraciju. Pretpostavlja se i da genski mutacioni procesi menjaju strukturu toksične ćelije. Neurodegeneracija vodi gubitku kondukcije i gliozu, a ređe je prisutna i inflamacija. Neurodegeneracija je prisutna ne samo u ćelijama sa akumuliranim aluminijumom nego i u susednom tkivu. Ovakva slika je u korelaciji sa amiloidnim plakama u Alchajmerovoj demenciji i povećanjem delta spektralne snage.

Elektrofiziološka, biheviornalna i histološka analiza pokazuju da je u osnovi sve tri analize neurotoksičnost posledica oksidativni stres koji oštećuje membrane lipida, aktivnost membranoznih proteina, Na-K-ATP-aza i PKC i ima antioksidativnu enzimsku aktivnost, SOD,GPx i GST (Sethi NK., 2008). Takođe je pokazano da su mehanizmi oksidativnog stresa isti kod mladih i starih jedinki (Makker K., 2009). Hronični tretman aluminijumom u dozi 0,5 mg/kg dnevno ima za posledicu slabljenje kognitivnih funkcija sa progresivnim tokom (Walton JR., 2009). Naša studija ukazuje na promene aktivnosti malog mozga kao izraz gubitka saznajnih funkcija, kao i na razlike i smanjenje motornih sposobnosti linearno sa starošću jedinke. Neurodegenerativni procesi ukazuju na različit uticaj različitih jedinjenja aluminijuma na Ca^{2+} homeostazu, verovatno zbog interakcije aluminijuma sa

regulatorima Ca^{2+} homeostaze, ali mehanizmi još nisu izučeni. Neurotoksičnost izazvana metalima (Al i Pb komparativno) ima slične promene koje sumarno se mogu okarakterisati kao oksidativni stres, biofizičke promene membrane, deregulacija ćelijske signalizacije i promene u neurotransmisiji (Versraeten SV., 2008). Sumarno ove promene u spektru snage se manifestuju porastom delta snage iznad kontrolne vrednosti od 45 % pa do 56 % kolika je plastičnost i tolerabilnost.

Aluminijum putem neurohemijskih promena izaziva oksidativni stres. Prve promene su redukcija vezikularnog transporta, a kao posledica toga redukuje se mikrotubularni transport, smanjenje ATP-a u aksonalnim mitohondrijama, redukcija sinaptičkih vezikula i promena Goldžijevog kompleksa (Verstraeten SV., 2008). Oksidativne promene su produkcija malondialdehida, karbonila, peroksinitriti, nitrotirozini, SOD, hemoksigenaze .

Apoptoza se javlja usled nakupljanja aluminijuma u ćeliji sto dovodi do depolarizacije i inhibicije Na/Ca pumpe usled čega se nakuplja Ca^{2+} u mitohondrijama i endoplazmatičnom retikulumu. Apoptoza je genski determinisana i aktivacija kaspazne grupe proteaza indukuju gensku promenu (Baharathi P., 2008). U animalnom modelu pokazano je prisustvo apoptotskih tela i kod mladih i kod starijih jedinki, a razlika je u tome što se kod starijih jedinki javlja i inflamacija na mestima intenzivnog nakupljanja aluminijuma (Čapo I., 2007).

Kod mladih pacova tretman aluminijumom u toku gestacije i laktacije ima genotoksičan, teratogen ili neuroplastičan efekat u razviću (Gomez M., 1990). Pretpostavlja se da je aktivacija posledica oksidativnog stresa mitohondija, lizozoma i jedra (Dobson A., 2000).

U analizi EEG-a, kod pacijenata sa dijagnostikovanom Alchajmerovom bolešću povećanje delta snage ima dijagnostički i prognostički smisao. Kao posebni fenomeni, a u saglasnosti sa animalnim modelom javljaju se oštećenje krvno-moždane barijere, oksidativni stres, neurodegeneracija i glutamatergična toksičnost. Različitosti su smanjenje teta ritma kod modela, tj. promena alfa ritma kod Alchajmerove demencije.

Mehanizmi neurotoksičnosti pokazuju da postoje ireverzibilni mehanizmi u osnovi toksičnosti. S obzirom na nemogućnost regulacije na molekularnom nivou, moguće je samo preuzimanje funkcije putem plastičnosti nervnog sistema.

5. ZAKLJUČAK

1. Pokazano je da aluminijum ima neurotoksično dejstvo i da postoje promene u ECoG aktivnosti kontrolnih i aluminijumom tretiranih pacova. U uslovima toksičnosti dolazi do povećanja relativne spektralne snage u delta opsegu pa se to može smatrati indikatorom toksičnosti.

2. Dizajn eksperimenta je takav da se u posebnim fiziološkim uslovima neurotoksičnosti ispituju promene na mozgu sa više elektrofizioloških aspekata. Pokazano je da efekat neurotoksičnosti se može opisati odnosom relativnih spektralnih snaga u delta i teta opsegu.

3. Rezultati studije ukazuju na varijabilnost u ispoljavanju neurotoksičnih efekata. Fraktalna analiza pokazuje da postoje razlike u aktivnosti velikog i malog mozga iako su molekularni mehanizmi toksičnosti isti.

4. Neurotoksični efekti su doзно zavisni i postoje razlike u aktivnosti kod mladunaca i kod odraslih jedinki.

5. Mehanizmi plastičnosti nervnog sistema imaju ulogu u kompenzaciji toksičnog stanja što se manifestuje promenama relativne spektralne snage u sigma i beta oblasti odnosno kao promene u ponašanju.

LITERATURA

ATSDR (1992): Toxicological profile for aluminium. Atlanta, GA, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (TP-91/01).

B.P. He and M.J. Strong (2000): A morphological analysis of the motor neuron degeneration and microglia reaction in acute and chronic in vivo aluminum chloride neurotoxicity. *J. Chem. Neuroanat.* 17, pp. 207–215.

Banquet J.P. (1973): Spectral analysis of the EEG in meditation. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 33,143-151.

Bharathi P. et al (2008): Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration. *Indian J. Med. Res.*,128,545-556.

Binienda Z.K., Beaudoin M.A., Thom B.T. Ali S.F. (2011): Analysis of electrical brain Waves in Neurotoxicology: Gamma-Hydroxybutyrate. *Curr Neuropharmacol.* 9(1), 236-239.

Bishop N.M., Morley R., Chiz B., Day J.P., Lucas A. and Engl N. (1997): Aluminium neurotoxicity in preterm infants receiving intravenous feeding solution. *Medicine* 336, 1557-1562.

Bloom F., Reilly J.F., Redwine J.M., Wu C. (2005): Mouse models of human neurodegenerative disorders. *Arch. Neurol.* 62: 185-187.

Campbell and S.C. Bondy, (2000): Aluminum induced oxidative events and its relation to inflammation: A role for the metal in Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Biol.* 46, pp. 721–730.

Campbell, A. (2004): Inflammation, Neurodegenerative Diseases and Environmental Exposures. *Ann.NY Acad. Sci.*, 1035: 117-132.

Choi DW. (1998): Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. 1:623–634.

Colomina M. T., Raig J.L., Torrente M., Vicens P. and Domingo J.L. (2005): Concurrent exposure to aluminium and stress during pregnancy in rats: Effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Neurotoxicology and Teratology*, 27, 565-574.

Colomina MT et al (1992): Concurrent ingestion of lactate and aluminum can result in developmental toxicity in mice. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*, 77:95-106.

Colomina MT. et al (1994): Lack of maternal and developmental toxicity in mice given high doses of aluminium hydroxide and ascorbic acid during gestation. *Pharmacology and toxicology*,74: 236-239.

Commissaris RL et al. (1982): Behavioral changes in rats after chronic aluminium and parathyroid hormone administration. *Neurobehavioral toxicology and teratology*, 4:403-410.

Connor DJ.,Jope RS., Harrell LE. (1988): Chronic oral aluminium administration to rats: cognition and cholinergic parameters. *Pharmacology ,biochemistry and behaviour*, 31:467-474.

Coppi A., Cabinian M., Mirelman D., Sinnis P. (2006): Antimalarial activity of allicin, a biologically active compound from garlic cloves. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 50(5):1731-7.

Cucarella C, Montoliu C., Hermenegildo C., Saez R., Manzo L., Minana MD., Felipo V. (1998): Chronic exposure to aluminum impairs neuronal glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway. *J Neurochem.* 70(4), 1609-14.

Čapo I. i Sekulić S. (2008): Model prenatalnog razvoja cerebelarnog korteksa kod zamoraca. *Eskulap.3* (3-4), 11-17.

Čapo I., Lalošević D., Čulić M., Grbić G., Kesić S., Martać Lj., Spasić S., Sekulić S., Rokvić N. (2007): Morphological and physiological aspect of aluminum intoxication on nerve cells. 3rd Serbian Congress for Microscopy. Belgrade, proceedings p 209-210.

Čapo I., Mitrović G., Lendak D. (2007): Neurotoksični efekat aluminijuma i njegov uticaj na nastanak Alchajmerove bolesti. *Eskulap* 2007, 2(4), 1-6.

Čulić M, Blanuša LM, Grbić GM, Spasić SZ, Janković B, Kalauzi A (2005): Spectral analysis of cerebellar activity after acute brain injury in anesthetized rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 65(1): 11-17.

Čulić M., Grbić G., Martać Blanus Lj., Spasić S., Janković B, Ranković R. (2003): Slow and fast oscillations in the activity of parietal cortex after brain injury. In: *From Basic Motor Control to Functional Recovery III* (Ed. N. Gantchev), pp. 41-45, St. Kliment Ohridski University Press, Sofia. (ISSBN: 954-07-1851-1).

Čulić M., Grbić G., Martać Lj., Todorović V., Drndarević N., Spasić S, Sekulić S. (2005): Neocortical plasticity after repeated brain injury in rats. In: *From Basic Motor Control to Functional Recovery IV* (Ed. N. Gantchev), pp. 317-321, Marin Drinov Academic Publishing House, Sofia. (ISSBN: 954-322-095-6)

Ćulić M., Grbić G., Šaponjić J., Martać Lj., B Janković, Kalauzi A., Jovanović A. (2001): Oscillation of cerebellar neuronal firing rates under intensified inhibitory and excitatory inputs in rats. In: From Basic Motor Control to Functional Recovery II (Ed. N. Gantchev), pp. 217-219, Prof. M. Drinov Academic Publ. House, Sofia .

Ćulić M., Martać Lj., Grbić G., Kesić S., Spasić S., Lalosević D., Sekulić S. (2007): Fractal analysis of brain activity in the rat model of cognitive dysfunction. Neuroscience today. Firenze, 26-28 March, poster 4;

Ćulić M., Martać Lj., Grbić G., Kesić S., Spasić S., Sekulić S., Lalosević D., Čapo I. (2007): Aluminum toxicity in rat brain: Electrophysiological, histological and behavioral evidence. In: From Basic Motor Control to Functional Recovery V (Ed. N. Gantchev), pp. 224-229, Sofia.

Ćulić M., Martać Lj., Grbić G., Spasić S., Kalauzi A., Janković B. (2002): Occurrence of gamma (33 - 128 Hz) activity in the cerebellum of anesthetized rats. FENS Abstr. Vol. 1, A192.1.

Dobson, A.W., Xu, Y., LeDoux, S.P., and Wilson, G.L. (2000): Enhanced mtDNA repair and cellular survival following oxidative stress by targeting the hOGG repair enzyme to mitochondria. J Biol Chem. 275:37518-37523.

Domingo JL et al.(1987): Nutritional and toxicological effects of short-term ingestion of aluminium in rat. Research communications in chemical pathology and pharmacology,57,129-132.

El-Rahman SS. (2003): Neuropathology of aluminum toxicity in rats glutamate and GABA impairment. Pharmacol. Res.,47 (3), 189-94.

Ferri R, Stam CJ, Lanuzza B, Cosentino F, Elia M, Musumeci S, Pennisi G (2004): Different EEG frequency band synchronization during nocturnal frontal lobe seizures. *Clin Neurophysiol* 115:1202–1211.

Frischknecht F., Martin B., Theyry I., Bourquoin C., Menard R. (2006): Using green fluorescent malaria parasites to screen for permissive vector mosquitoes. *Malar. J.* 5:23.

Gomez M et al. (1990): Evaluation of the maternal and developmental toxicity of aluminum from high doses of aluminum hydroxide in rats. *Veterinary and human toxicology*, 32:545-548.

Gomez M, Domingo JL, Llobet JM (1991): Developmental toxicity evaluation of oral aluminum in rats: influence of citrate. *Neurotoxicology and teratology*, 13:323-328.

Grbic G., Culic M., Spasic S., Kesic S. (2006): Fractal analysis of brain activity in rats treated with aluminium. 5th FENS, Vienna, 8-12 July, Vol 3, A130.21.

Greenamyre JT (1986): The role of glutamate in neurotransmission and in neurologic disease. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol* 9: 154–161.

Harris C.M. (1998): The Fourier analysis of biological transients, *Journal of Neuroscience Methods*, 83, 15-34.

Hasler G. et al. (2004): Discovering endophenotypes for major depression. *Neuropsychopharmacology* 29, 1765-1781.

Hicks JS, Hackett DS, Sprague GL (1987): Toxicity and aluminium concentration in bone following dietary administration of two sodium aluminium phosphate formulations in rats. *Food and chemical toxicology*, 25(7):533-538.

Higuchi T (1988): Approach to an irregular time series on the basis of the fractal theory. *Physica D* 31:277–283.

Hirai T. (1960): Electroencephalographic Study of Zen Meditation. *Psychiat.Neurol.Jap.* 62,76-105.

Hiseida H., Maekawa Y.,Iwakawa D. et al. (2004): Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat.Med.*10(1):29-30.

Hugon J, Vallat JM, Dumas M. (1996): Role of glutamate and excitotoxicity in neurologic diseases. *Rev Neurol (Paris)*. Apr;152(4):239-48.

Indiradevi KP, Elias E, Sathidevi PS (2009): Complexity analysis of electroencephalogram records of epileptic patients using Hurst exponent. *Int. J. Med. Eng. Inform.*1: 368-380.

Jeong J, Chae J-H, Kim SY, Han S-H. (2001): Nonlinear dynamic analysis of the EEG in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *J. Clin Neurophysiol* 18:58–67.

Jovanović A. (2004): Biomedical Image and Signal Processing. School of mathematics, University of Belgrade

Jope R.S., Johnson G.V. (1992): Neurotoxic effects of dietary aluminum. *Ciba Found.Symp.*169; 254-267.

Julka D, Vasistha RK, Gill KD (1996): Distribution of aluminum in different brain regions and body organs of rats. *Biol Trace Elem Res*, 52:181-192.

Kalauzi A., Spasić S., Martać Lj., Grbić G., Čulić M. (2002): Occurrence of gamma (33 - 128 Hz) activity in rat somatosensory cortex. FENS Abstr. Vol 1, A024.17.

Kandel E., Schwartz J. Jessell T(2000): Principles of neural science, 4 edition, Mc Graw-Hill Companies, 913-918.

Kandel E., Schwartz J. Jessell T(2000): Principles of neural science, 4 edition, Mc Graw-Hill Companies, 913-918.

Katz M. (1988): Fractals and the analysis of waveforms. Comput Biol Med 18(3): 145-156.

Kawahara M. (2005): Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. J. Alzheimers Dis. 8,(2),171-82

Kekovic G, Stojadinovic G, Martac Lj, Podgorac J, Sekulic S, Culic M (2010): Spectral and fractal measures of cerebellar and cerebral activity in various types of anesthesia. Acta Neurobiologiae Experimentalis 70(1): 67–75.

Keković G., Stojadinović G, Martać Lj., Podgorac J., Sekulić S. (2010): Spectral and fractal measures of cerebellar and cerebral activity in various types of anesthesia. Acta Neurobiologie Experimentalis, vol. 70 br. 1, str. 67-75.

Keković G., Čulić M., Martać Lj., Stojadinović G., Čapo I., Lalošević D., Sekulić S. (2010): Fractal dimension values of cerebral and cerebellar activity in rats loaded with aluminium. Medical&Biological Engineering& Computing, Vol. 48, br.7, Str. 671-679.

Kesic S., Martac Lj., Grbic G., Spasic S., Sekulic S., Lalošević D. (2006): Spectral analysis of cerebral electrocortical activity in rats treated with aluminium. *Neurobiology Today*. pp6.

Kostopolus G.(1985): Neuronal sensitivity to GABA and glutamate in generalized epilepsy with spike and wave discharges,*Experimental Neurology* 92,20-36.

Kumar Manish and Swarup D. (2009): Oxidative stress and genotoxicity in relation to micro-mineral deficiency in cattle of Bihar districts.Pp 183, Proceedings of the International Summit on Advancing veterinary Medical care: Challenges and Strategies and 27th ISVM convention Satellite Seminar on Veterinary Internal Medicine 19-21 Feb, 2009.

Kumar V.,Gill KD. (2009): Neurobihevorl and oxidative aspects. *Arch Toxicol.* 83(11)965-78.

Kušić D. (1994): Integracija sofvorskog okruženja za EEG analizu. B.Sc.thesis, Faculty of Electrical Engineering, University of Belgrade.

Lopes da Silva F.(1987): EEG analysis: Theory and practice Electroencephalography Basic Principles, Clinical Applications and Related Fields. Niedermeyer E and Lopes da Silva F eds. Urban and Schwarzenberg, Baltimore.

Makker K. et all (2009): Oxidative stress and male infertility. *Indian J.Med.Res.*129,pp 357-367.

Mandelbrot BB. (1982): *The fractal geometry of nature*. W. H. Freeman and Company.

Martac Lj ., Kesic S., Culic M., Grbic G., Spasic S., Sekulic S., Lalošević D. (2006): Effect of aluminium neurotoxicity on rat brain electrocortical activity. *Acta Physiol.Pharmacol.Serb.,Vol.42. No. 3, 219-225.*

Martac Lj., Grbic G., Kekovic G., Podgorac J., Culic M., Sekulic S., Lalošević D., Capo I. (2010): Spectral Changes Of Brain Activity In Rat Offspring Exposed To Aluminium During Gestation And Lactation. Archives of Biological Sciences, Vol.62.No1,9-13.

Martac Lj., Podgorac J., Sekulic S. (2010): Evaluation of the Neurotoxic effect of Aluminium on the Wistar Rat. Archives of Biological Sciences, Vol.62.No3, 585-588.

Martinović Ž.J.(2001): Epileptiformni EEG obrasci u dece. Zbornik radova i sažetaka, VII Jugoslovenski kongres kliničke neurofiziologije sa međunarodnim učešćem.

Meiri H., Banin E., Roll M., Rouesseau A.(1993): Toxic effects of aluminum on nerve cells and synaptic transmission. Prog. Neurobiol.,40:89-121.

Miu A.C. ,Andreescu C.E. (2003): A behavioral and histological study of the effects of long term exposure of adult rats to aluminum. Intern J.Neuroscience, 113,1197-1211.

Miu AC, Benga O.(2006): Aluminum and Alzheimer's disease: a new look. J Alzheimers Dis.10(2-3):179-201.

Moshtaghi A.A., Rahimi S., Messripour M. (1999): Aluminium administration on acetylcholinesterase activity of different regions of rat brain. Medical Journal of Islamic Academy of sciences.,12 , 4,105-108.

Nayak P, Chatterjee AK (2001): Effect of aluminum exposure in brain glutamate and GABA systems : an experimental study in rats. Food Chem Toxicol.39,1285-128.

Nayak P. (2002): Aluminum : Impacts and Disease. *Environ Res.*,89:111-115.
P.F. Zatta, Biological models for the study of aluminium neurotoxicity. *Acta Med. Rom.* 35 (1997), pp. 592–600.

Papp A. , Pecze L., Vezer T. (2005): Acute neurotoxicity of heavy metals combined with alcohol. *Arh Hig Rada Toksikol* 56,241-248.

Percy ME., Kruck TP.,Pogue AI.,Lukiw WJ. (2011): Towards the prevention of potential aluminum toxic effects and an effective treatment for Alzheimers disease. *J.Inorg.Biochem.* 105(11),1505-12.

Petrosian A. (1995): Kolmogorov complexity of finite sequences and recognition of different preictal EEG patterns. *Proc IEEE Symposium on Computer-Based Medical System.* p212-217.

Ros J., Pecinska N., Beat A., Landolt H.,Fillenz M.(2001): Lactate reduces glutamate induced neurotoxicity in rat cortex. *Journal of Neuroscience Research*,Vol.66,(5), 790-794.

Rutecki P.(1990):Anatomical,physiological and theoretical basis for the antiepileptic effect of vagus nerve stimulation,*Epilepsia*,31,S1-S6.

Schroeder MA, Mitchener M (1975a): Life-term effects of mercury, methylmercury and nine other trace metals on mice. *Journal of nutrition*, 105:452-458.

Schroeder MA, Mitchener M (1975b): Life-term studies in rats: effects of aluminum, barium, beryllium, and tungsten. *Journal of nutrition*, 105:421-427.

Sethi NK, Torgovnick J, Sethi PK. (2008): Rhythmic artifact of physiotherapy in intensive care unit EEG recordings. *J Clin Neurophysiol.* Feb;25(1):62.

Shcherbatzkh I., Carpenter DO. (2007): The role of metals in the etiology of Alzheimers disease. *J.Alzheimers Dis.* 11(2),191-205.

Sirven J.I., Sperling M.R., French J.A. i O Connor M.J.(1996): Significance of simple partial seizures in temporal lobe epilepsy, *Epilepsia*,37(5),450-454

Spasic S, Kalauzi A, Culic M, Grbic G, Martac Lj (2005b): Fractal analysis of rat brain activity after injury. *Med. Biol. Eng. Comput.* 43, 345-348.

Spasić S, Čulić M, Grbić G, Martać Lj, Sekulić S, Mutavdžić D (2008): Spectral and fractal analysis of cerebellar activity after single and repeated brain injury. *Bulletin of Mathematical Biology* Vol. 70 , No. 4, pp. 1235-1249.

Spasić S, Kesić S, Kalauzi A, Šaponjić J (2011): Different anaesthesia in rat induces distinct inter-structure brain dynamic detected by Higuchi fractal dimension. *Fractals*, Vo.19, No.1, pp.113-123.

Uchida S., Nishida M., Hirai N., Miwakeichi F.(2001): Does hippocampal theta exist in the human brain, *Neurobiologz of Sleep-Wakefulness Czcle* 1(1),1-8.

Rondeau V., Commenges D., Jacqmin-Gadda H. and Dartigues J.F.(2000): Relation between aluminum concentrations in drinking water and Alzheimer's disease: An 8 year follow-up study. *Am. J. Epidemiol.* 152, pp. 59–66.

Van Dam D., DHooge R., Staufenbiel M., Van Ginneken C., Van Meir F., De P.P. (2003): Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *Eur.J.Neurosci.* 7: 388-396.

Van Luijtelaar, E.L.J.M., Budziszewska B., Jaworska-Feil L., Coenen, A.M.L. & Lason W. (2000): The ovarian cycle in rats: a long term EEG study, *The Nijmegen-Moscow research*, 61-70.

Verstraeten S.V., Aimo L., Oteiza P. (2008): Aluminium and lead molecular mechanisms of brain toxicity. *Arch.Toxicol.* 82(11), 789-802.

Walton J. (1998): Absorption of aluminium and its effect on brain cells. In: *Aluminium: report of an international meeting, Brisbane, 20-21 April, 1995*, Eds. P. Imray, M. R. Moore, P. W. Callan, W. Lock, Rundle Mall- Public and Environmental Health Service, pp.22-34.

Walton JR (2009): Brain lesions comprised of aluminum-rich cells that lack microtubules may be associated with the cognitive deficit of Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 30:1059-69.

Walton JR. (2009): Functional impairment in aged rats chronically exposed to human range dietary aluminum equivalents. *Neurotoxicology* 30:182-193.

White HS (1997): Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potential antiepileptic drugs. *Epilepsia* 38, Suppl:S9-17.

WHO (1997): *Aluminium*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 194).

Willis W.D., Grossman R.G. (1977): EEG In *Medical neurobiology*, 225-227.

Woodruff-Pak DS., Agelan A., Del Valle L. (2007): A rabbit model of Alzheimer's disease. Valid at neuropathological, cognitive and therapeutic levels. *J. Alzheimer's Dis.* 11: 371-383.

Wright J.J.(1997): EEG simulation,Variation of Spectral Envelope,Pulse synchrony and 40 Hz oscillation,Biological Cybernetics

Yokel RA: (2000): The toxicology of aluminium in the brain: a review. Neurotoxicology 21: 813-828.

Yumoto H., Nagai H., Matzuzaki T., Kobayashi W., Tada Y., Ohki Y., Kakimi S., and Kobayashi K. (2000): Transplacental passage of Al transfer to suckling rats. Nuclei Instrum.Phys. 172, 925-929.

BIOGRAFIJA

Ime i prezime: *Ljiljana D. Martać*

Datum rođenja: 15. 07. 1971. god.

Obrazovanje:

1999-Diplomirala na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu

Molekularnu biologiju i fiziologiju

2004- Magistrirala na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu

Zanimanje: Istraživač saradnik na Institutu za Biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Adresa: Bulevar Despota Stefana 142

Institut za Biološka istraživanja "Siniša Stanković"

E-mail: ljmartac@ibiss.bg.ac.rs

Kongresna saopštenja:

Martać Lj ., Ćulić M., Grbić G., Spasić S. (2003): Slow and fast oscillations in the activity of left and right cerebellar cortex after brain injury in rats. 10th Young Neuroscientists Meeting, Trieste, May 29th, Abstr., p12

Martać-Blanuša Lj., Grbić G., Kalauzi A., Perišić D., Jovanović A. (2003): Methodological approaches in EEG analysis of rat brain: 3D spectroscopy and mean power spectra. Conference of physiological science with international participation: "Risk factors and health: from molecule to the scientific basis of prevention" Belgrade & Zrenjanin, November 7-9, Abstr., pp195

Martać Lj., Čulić M., Grbić G., Kalauzi A., Spasić S. (2004): The effect of cerebellar injury on spectral characteristics of cerebellar electrocortical activity in rats. 4th FENS, Lisbon, 10-14 July, Vol 1, A129.10

Martać Lj., Čulić M., Grbić G., Kalauzi A., Spasić S. (2004): The effect of cerebellar injury on spectral characteristics of cerebellar electrocortical activity in rats. 4th FENS, Lisbon, 10-14 July, Vol 1, A129.10

Martać Lj., Grbić G., Čulić M., Kesić S., Spasić S. (2007): Spectral changes of brain activity in the rat model of aluminum intoxication. Workshop "Current aspect in the field of Alzheimer research" Germany, Bad Honnef, May 14-17th, strana 32-33; poster.

Publikacije - izbor:

Martać Lj., Kesić S., Čulić M., Grbić G., Spasić S., Sekulić S., Lalošević D. (2006). Effect of aluminium neurotoxicity on rat brain electrocortical activity. Acta Physiol.Pharmacol.Serb.,Vol.42. No. 3, 219-225.

Martać Lj., Podgorac J., Sekulić S. (2010). Evaluation of the Neurotoxic effect of Aluminium on the Wistar Rat. Archives of Biological Sciences, Vol.62.No3, 585-588.

Martać Lj., Grbić G., Keković G., Podgorac J., Čulić M., Sekulić S., Lalošević D., Čapo I. (2010). Spectral Changes Of Brain Activity In Rat Offspring Exposed To Aluminium During Gestation And Lactation. Archives of Biological Sciences, Vol.62.No1,9-13

Keković G., Čulić M., Martać Lj., Stojadinović G., Čapo I., Lalošević D., Sekulić S. (2010): Fractal dimension values of cerebral and cerebellar activity in rats loaded with aluminium. MEDICAL&BIOLOGICAL ENGINEERING&COMPUTING,vol.48 br.7, str.671-679.

Keković G., Stojadinović G., Martać Lj., Podgorac J., Sekulić S., Čulić M. (2010): Spectral and fractal measures of cerebellar activity in various types of anesthesia. ACTA NEUROBIOLOGIAE EXPERIMENTALIS, vol.70 br.1, str.67-75.

Čulić, M., Martać, Lj., Grbić, G., Kesić, S., Spasić, S., Sekulić, S., Lalošević, D., Čapo, I., 2007. Aluminum toxicity in rat brain: Electrophysiological, histological and behavioral

evidence. In: Gantchev, N. (Ed.), *From Basic Motor Control to Functional Recovery V*, Sofia, Bulgaria, pp. 224-230.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Liljana Martać

број индекса KB07 0007

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Spektralna analiza elektrokortikalne aktivnosti mozga pacova u modelu intoksikacije aluminijumom

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 03.09.2013. _____



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ljiljana Martać

Број индекса KB07 0007_

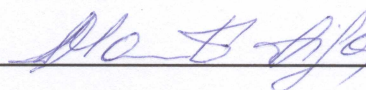
Студијски програм Neuronauke

Наслов рада Spektralna analiza elektrokortikalne aktivnosti mozga pacova u modelu intoksikacije aluminijumom

Ментор dr. Lidija Radenović, redovni profesor Biološkog fakulteta BU

dr. Slađana Spasić, viši naučni saradnik Instituta za multidisciplinarna istraživanja BU

Потписани/а Ljiljana Martać



Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 03.09.2013. _____

 _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Spektralna analiza elektrokortikalne aktivnosti mozga pacova u modelu intoksikacije aluminijumom

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.


Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 03.09.2013. _____



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.