

Univerzitet u Beogradu
Medicinski fakultet

Milica D. Velimirović

**Uticaj pretretmana vitaminom D na
strukturne i biohemijske promene
uzrokovane prolaznom globalnom ishemijom
mozga džerbila**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

University of Belgrade
School of Medicine

Milica D. Velimirović

**The effects of vitamin D pretreatment on
structural and biochemical changes in the
brain of gerbils exposed to transient global
cerebral ischemia**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

MENTOR:

dr Nataša Petronijević, redovni profesor, Institut za medicinsku i kliničku biohemiju,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Aleksandra Isaković, redovni profesor, Institut za medicinsku i kliničku biohemiju,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Nela Puškaš, vanredni profesor, Institut za histologiju i embriologiju „Aleksandar
Đ. Kostić”, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Vesna Selaković, redovni profesor, Medicinski fakultet Vojnomedicinske
akademije, Univerzitet odbrane u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____

Ova doktorska teza je urađena u Laboratoriji Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije, pod rukovodstvom prof. dr Nataše Petronijević. Doktorska teza je realizovana u okviru projekta Ministarstva nauke Republike Srbije br 175058: „Strukturne i biohemijske karakteristike poremećaja sinaptičke plastičnosti u psihijatrijskim oboljenjima“, čiji je rukovodilac prof. dr Nataše Petronijević i uz podršku projekta Univerziteta Odbrane u Beogradu br MFVMA/11/16-18: „Ishemija mozga - mehanizmi oštećenja i neuroprotekcija“, čiji je rukovodilac prof. dr Vesna Selaković Mićunović.

Izradi ove doktorske teze su svojim znanjem, podrškom, razumevanjem, strpljenjem i ljubavlju doprineli moji učitelji, saradnici, prijatelji i moja porodica.

Prvenstveno se zahvaljujem svom učitelju i mentoru, prof. dr Nataši Petronijević, na ogromnoj energiji i trudu koji je uložila u ovaj rad, kao i na ukazanom poverenju i bezrezervnoj ličnoj i profesionalnoj podršci. Njena sistematičnost, upornost i pronicljivost rešavale su sa lakoćom probleme koji su mi se nekada činili nepremostivim. Naučila me je neusiljenom dostojanstvu, obzirnosti i strpljenju, ali i težnji da se ne zadovoljavam površnim shvatanjem problematike. Profesorkin veliki entuzijizam i korisni saveti su učinili da rad na tezi bude znatno lakši.

Dr Neveni Radonjić, koja me je uvela u svet biohemije i eksperimentalnog rada. Način na koji pristupa radu, stručnost, disciplina, optimizam, kao i energičnošću kojom je prenosila svoja znanja su mi bila velika inspiracija, smernica i podsticaj da dalje nastavim svoje usavršavanje.

Prof. dr Neli Puškaš, koja mi je pružila veliku podršku tokom izrade ove teze. Profesorka je svojim iskustvom i stručnošću podržala moj eksperimentalni rad i bila uvek pozitivnog i vedrog duha.

Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademiji, Prof. dr Vesni Selaković i saradnicima Instituta za medicinska istraživanja, na svom angažovanju i pomoći u realizaciji ovog istraživanja.

Svim kolegama sa Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu na ukazanoj dugogodišnjoj podršci, poverenju i prijateljskoj radnoj atmosferi. Moram istaći posebnu zahvalnost Prof. dr Aleksandri Isaković na stručnoj pomoći, nesebičnom ličnom angažovanju i dostupnosti, kao i na izuzetno korisnim savetima i sugestijama tokom završnih faza izrade ove teze.

Svojim kolegama iz laboratorije – Goci, Tihomiru, Milici, Tanji, Mikanu i Marku na podršci, pomoći i prijateljskoj atmosferi tokom mog naučnog sazrevanja.

Posebno se zahvaljujem svojoj prijateljici i kolegici Anđelki od koje sam imala prilike mnogo da naučim proteklih godina. Zahvalna sam joj na entuzijastičnom pristupu nauci, pomoći u laboratorijskom radu, podršci koju pruža od kad smo se upoznale, kao i podsticaju, savetima i zanimljivim diskusijama kojima mi je izuzetno pomogla.

Dr Ivanu Zaletelu, koji je velikodušno podelio sa mnom svoja znanja, koji se stalno interesovao za moj rad i veselim komentarima činio da prepreke na koje sam nailazila sagledam sa jedne optimističnije strane.

Zahvaljujem se i svojim studentima dr Zlatku Pravdiću i Mariji Malinić na ukazanom poverenju i prilici da im prenesem svoja znanja, ali i da u isto vreme uz njih učim.

Zahvalnost dugujem i svojim prijateljima na razumevanju i podršci u svakom trenutku.

Ogromnu zahvalnost osećam prema svom suprugu Ivanu koji mi je bio veliki oslonac i koji me je bezrezervno podržavao, svako malo zasmeyavao i svojim primerom me podsećao na stvari koje su stvarno bitne u životu.

Na kraju, želim da se zahvalim mojim bakama i dekama za bezbrižno detinjstvo i podstreke od najmlađih dana. Svojim roditeljima, Bilji, sestrama Bojani i Ivi i bratu Dimitriju se beskrajno i iskreno zahvaljujem na bezuslovnoj veri, ljubavi, podršci i pomoći koju su mi pružali svih ovih godina. Posebno se zahvaljujem mami, mom najvećem satelitu, na neizmernom strpljenju i razumevanju koje je imala za mene, kao i za sve žrtve koje je podnela, stoga joj ovu tezu posvećujem.

U Beogradu, maj 2018. godine

Dr Milica Velimirović

Uticaj pretretmana vitaminom D na strukturne i biohemijske promene uzrokovane prolaznom globalnom ishemijom mozga džerbila

REZIME

Uvod: Cerebralna ishemija nastupa kada protok krvi opadne ispod 20% normalnog protoka, dovodeći do smanjenog dotoka kiseonika i glukoze u mozak, i posledično poremećaja jonske homeostaze, smanjenje sinteze ATP-a, povećano oslobađanje glutamata i ekscitotoksičnost. U patogenezi moždane ishemije važno mesto ima povećano oslobađanje slobodnih radikala (ROS) odnosno nastanak oksidativnog stresa. Važno je što ranije ponovo uspostaviti cirkulaciju, međutim reperfuzija uzrokuje još veću produkciju slobodnih radikala i iscrpljivanje antioksidativnih kapaciteta ćelije. Potencijalni izvor ROS u ishemiji i reperfuziji mozga predstavljaju enzimi NADPH oksidaze (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaze), čija je fiziološka funkcija stvaranje superoksidnog anjona. U ćelijama CNS-a (neuronima, astrocitima, mikrogliji), detektovana je ekspresija NOX2 (gp91^{phox}) proteina, koji u asocijaciji sa p22^{phox}, GTP-Rac, p47^{phox}, p67^{phox} i p40^{phox} produkuje superoksidni anjon, dok je NOX4 je najzastupljenija izoforma na nivou vaskularne mreže. Kako NOX2 i NOX4 mogu predstavljati značajan izvor oksidativnog stresa nakon ishemije mozga ove izoforme predstavljaju potencijalne terapijske mete. Ishemijsko/reperfuziono (I/R) oštećenje pokreće i proces apoptoze i izaziva poremećaj procesa autofagije pri čemu uloga koju autofagija ima u ishemiji mozga još uvek nije razjašnjena. Sve se više proučava uloga vitamina D (vitD) u prevenciji kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti. Dosadašnje studije su pokazale da je snižena koncentracija vitamina D u serumu povezana sa povećanim rizikom od ishemijskog moždanog udara, kao i sa pogoršanjem ishemijskog oštećenja, težim funkcionalnim oporavkom i kognitivnim disbalansom. Uloga i mehanizmi delovanja vitamina D u cerebralnoj ishemiji još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni.

Cilj: Ispitati efekte pretretmana vitaminom D na parametre oksidativnog stresa, apoptoze, autofagije i zastupljenost pojedinih ćelija centralnog nervnog sistema upotrebom odgovarajućih markera u prefrontalnom korteksu i hipokampusu mongolskih

džerbila izloženih desetominutnoj prolaznoj globalnoj ishemiji mozga i reperfuziji u trajanju od jednog, tri ili sedam dana.

Materijal i metode: U eksperimentu su korišćeni mongolski džerbili - *Meriones unguiculatus*, muškog pola podeljeni u sedam grupa. U kontrolnoj grupi (n=16) životinje su podvrgnute hirurškoj intervenciji bez izazivanja ishemije. Četrdeset osam životinja je podvrgnuto procesu ishemije tokom 10 minuta, nakon čega su podeljene u tri eksperimentalne grupe. Prva grupa (n=16) bila je izložena reperfuziji u trajanju od jednog dana (I/R 1d), druga (n=16) u trajanju od 3 dana (I/R 3d) i treća (n=16) sedam dana (I/R 7d). Drugih 48 životinja je tretirano vitaminom D sedam dana pre podvrgavanja procesu ishemije, nakon koje su podeljene u tri grupe u odnosu na trajanje reperfuzije. U prvoj grupi (n=16) reperfuzija je trajala jedan dan (vitD+I/R 1d), u drugoj (n=16) tri dana (vitD+I/R 3d) i u trećoj (n=16) sedam dana (vitD+I/R 7d). Aktivna forma vitamina D (1,25-(OH)₂D₃) je aplikovana intraperitonealno (*i.p.*) u dozi 1μg/kg na dan tokom sedam dana. Desetominutna prolazna globalna ishemija je izazivana postavljanjem mikroaneurizmatičkih klipsova na obe zajedničke karotidne arterije, nakon čega je usledila reperfuzija. Količina superoksidnog anjona, sulfhidrilnih grupa, redukovanog glutationa (GSH) i malondialdehida (MDA), kao i aktivnost enzima superoksid dizmutaze (SOD), glutation peroksidaze (GPx), glutation reduktaze (GR) i gama glutamil cistein ligaze (γGCL) su određivane spektrofotometrijski. Ekspresija proteina gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, NOX4, SOD1, SOD2, apoptoza indukujući factor (AIF), kaspaza 3 (Cas3), beclin 1, LC3, p62, NeuN, GFAP, Iba1, PV i β-aktin je određivana tehnikom Western blot-a. Zastupljenost neurona (neuron-specifični jedarni protein, NeuN), interneurona (parvalbumin pozitivni neuroni, PV), astrocita (glijalni fibrilarni kiseli protein, GFAP), i mikroglije (jonizovani kalcijum-vezujući adapterski protein, Iba1) je analizirana tehnikom imunohistohemije. Ultrastrukturne promene u mozgu džerbila su praćene tehnikom transmisiona elektronske mikroskopije.

Rezultati: Rezultati ovog istraživanja ukazuju da desetominutna prolazna ishemija mozga i reperfuzija u trajanju od jednog i tri dana dovode do pojave porasta nivoa MDA u korteksu, dok su u hipokampusu vrednosti ovog parametra bile povišene nakon prvog i sedmog dana reperfuzije. Pretretman vitaminom D je uticao na očuvanje kontrolnih nivoa MDA u obe ispitivane strukture. Nivo superoksidnog anjona je bio povišen u u

prva tri dana nakon I/R u odnosu na kontrolu u obe ispitivane strukture. Vitamin D je doprineo očuvanju nivoa superoksidnog anjona u opsegu vrednosti u kontrolnoj grupi u svim grupama osim u korteksu nakon prvog dana reperfuzije gde je koncentracija ovog pokazatelja i dalje bila značajno niža u poređenju sa I/R 1d grupom. Nivoi sulfhidrilnih grupa su bili sniženi u svim I/R eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolu, dok je vitamin D je uticao na oporavak njihovog nivoa u korteksu već tri dana nakon reperfuzije, a u hipokampusu nakon sedmog dana. U korteksu je koncentracija GSH bila značajno niža u prvom danu nakon ishemije u obe grupe, dok je u vitamin D pretretiranim grupama ovaj pad prisutan u prva tri dana. U hipokampusu je u svim grupama pretretiranim vitaminom D nivo GSH bio značajno viši u poređenju sa odgovarajućom I/R grupom. Aktivnost GR u I/R grupama u korteksu nije bila izmenjena, dok je u hipokampusu bila značajno veća u odnosu na kontrolu. Pretretman vitaminom D povećao je aktivnost ovog enzima u obe ispitivane strukture u poređenju sa odgovarajućim I/R grupama. U obe ispitivane strukture aktivnost GPx je bila snižena u I/R grupama u poređenju sa kontrolom i odgovarajućim vitamin D pretretiranim grupama. Aktivnost γ GCL je bila povišena u svim vitD grupama u poređenju sa odgovarajućim I/R grupama u obe ispitivane strukture. U hipokampusu je u svim I/R grupama bilo prisutno sniženje aktivnosti ovog enzima u poređenju sa kontrolom. Aktivnost SOD u korteksu nije bila značajno izmenjena, dok je u hipokampusu aktivnost bila značajno veća u trećem i sedmom danu nakon I/R u svim grupama u poređenju sa kontrolom. Ekspresija SOD1 je bila snižena u I/R 1d grupi dok se u narednim fazama reperfuzije ekspresija vratila na kontrolni nivo. U hipokampusu u svim I/R grupama ekspresija SOD1 je bila značajno snižena u poređenju sa kontrolom. U obe strukture vitamin D u trećem danu reperfuzije je uticao na značajno povećanje ekspresije SOD1 u poređenju sa kontrolom, ali je u prvom i sedmom danu ona bila značajno niža. U hipokampusu ekspresija SOD2 je bila značajno snižena u svim ispitivanim grupama, dok je u korteksu u vitD+I/R 1d i I/R 3d grupi bila na nivou vrednosti u kontrolnoj grupi. Ekspresija gp91^{phox} je bila povišena u svim I/R grupama u poređenju sa kontrolom, dok je u odgovarajućim vitamin D grupama došlo do značajnog smanjenja ekspresije ove subjedinice NOX2. U hipokampusu ekspresija gp91^{phox} je bila značajno viša u I/R 1d i I/R 7d grupi, ali je u I/R 3d grupi bila značajno niža u poređenju sa kontrolom grupom. U svim vitamin D pretretiranim grupama

ekspresija gp91^{phox} je bila značajno niža u odnosu na odgovarajuće I/R grupe. U korteksu ekspresija NOX4 je bila povišena u trećem danu reperfuzije, da bi u sedmom danu u I/R grupi bila ispod kontrolnih vrednosti, dok se u vitamin D grupi vratila na kontrolnu vrednost. U hipokampusu ekspresija NOX4 je bila snižena u I/R 1d, I/R 3d, vitD+I/R 3d i vitD+I/R 7d u poređenju sa kontrolom. U korteksu ekspresija p22^{phox} je bila povišena nakon prvog dana reperfuzije nakon I/R, dok je i u vitamin D grupi ekspresija bila povišena u odnosu na kontrolu prvog i sedmog dana nakon I/R. U hipokampusu, ekspresija p22^{phox} je bila povišena u I/R 1d, dok je u svim drugim eksperimentalnim grupama bila niža u poređenju sa kontrolnom grupom. U korteksu ekspresija p47^{phox} je bila niža u svim I/R grupama u poređenju sa kontrolom i odgovarajućom vitamin D grupom. U hipokampusu ekspresija p47^{phox} je bila niža u odnosu na kontrolnu grupu u svim grupama osim u I/R 1d grupi. U korteksu ekspresija p67^{phox} je bila niža u I/R 3d i I/R 7d grupama u poređenju sa kontrolom, dok je u hipokampusu u I/R 7d grupi bila veća u odnosu na kontrolu. Vitaminom D pretretirane grupe životinja u prvom danu reperfuzije eksprimirale su više nivoe p67^{phox} u odnosu na kontrolnu grupu u obe ispitivane strukture. Ekspresija proteina AIF i Cas3 u korteksu je bila povišena u grupama u kojima je reperfuzija trajala tri dana. U hipokampusu ekspresija AIF-a je bila snižena u svim I/R grupama u odnosu na kontrolu, dok je pretretman vitaminom D održao ekspresiju AIF-a na kontrolnom nivou. Ekspresija Cas3 u hipokampusu je snižena u trećem danu nakon I/R. U korteksu ekspresija beklina 1 je bila povišena nakon trećeg dana. U hipokampusu ekspresija beklina 1 je bila povišena u vitD+I/R 1d i vitD+I/R 3d grupama u odnosu na kontrolu i odgovarajuću I/R grupu. Ekspresija LC3 u korteksu je bila značajno niža u svim grupama osim u I/R 7d grupi u poređenju sa kontrolom. U hipokampusu u vitD+I/R 1d grupi ekspresija LC3 je bila značajno niža, dok je u ostalim vitD grupama i I/R 7d grupi povišena u odnosu na kontrolu. Ekspresija p62 je bila snižena u svim grupama u obe ispitivane strukture u odnosu na kontrolu. Ekspresija NeuN i broj neurona su opadali nakon tri dana od I/R, dok je vitamin D preteretiranim grupama ovaj pad uočen sedmog dana reperfuzije u obe ispitivane strukture. Pretretman vitaminom D je u hipokampusu uticao na održavanje kontrolnih nivoa ili povećanje ekspresije PV u zavisnosti od faze reperfuzije. Vitamin D je doprineo povećanoj ekspresiji GFAP-a i broja GFAP+ ćelija u obe strukture nakon I/R povrede i povećanje ekspresije Iba1 markera. U obe ispitivane strukture ekspresija

VDR je bila povišena u vitD+I/R 1d grupi u odnosu na kontrolnu i I/R 1d grupu. U ostalim eksperimentalnim grupama ekspresija VDR je bila značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu, ali je u svim vitD tretiranim grupama bila značajno viša u poređenju sa odgovarajućim I/R grupama.

Zaključak: Rezultati ovog istraživanja su pokazali da desetominutna globalna tranzitorna ishemija mozga nakon jednog, tri i sedam dana reperfuzije dovodi do oksidativnog stresa, promene u ekspresiji NOX2 i NOX4 i intenziviranja procesa apoptoze i autofagije. Što je još važnije, ova studija je pokazala da suplementacija vitaminom D pre I/R smanjuje oksidativni stres. S druge strane pretretman vitaminom D je različito uticao na ekspresiju NOX2 i NOX4 u zavisnosti od moždane strukture i dužine trajanja reperfuzije. Ovom studijom nije primećen uticaj vitamina D na najveći broj ispitivanih proteina apoptoze i autofagije. Zapažena je samo povećana ekspresija beklina 1 u hipokampusu posle jednog i tri dana reperfuzije. Vitamin D je odložio umiranje neurona i sprečio je umiranje PV+ ćelija u hipokampusu. Vitamin D je pokazao protektivan uticaj na preživljavanje astrocita u uslovima prolazne globalne ishemije koji su značajni za oporavak i regeneraciju tkiva. Takođe je nakon sedam dana reperfuzije u životinja pretretiranih vitaminom D zapažena povećana ekspresiju markera mikroglije koja ima protektivno dejstvo nakon ishemijske povrede mozga. Povećana ekspresija VDR nakon prvog dana reperfuzije kod životinja pretretiranih vitaminom D i podvrgnutih I/R ukazuje na to da suplementacija ima smisla bez obzira na početni nivo vitamina D.

Ključne reči: moždana ishemija, vitamin D, NADPH oksidaza, enzimi antioksidativne zaštite, slobodni radikali, džerbili

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Neuronauke

The effects of vitamin D pretreatment on structural and biochemical changes in the brain of gerbils exposed to transient global cerebral ischemia

ABSTRACT

Introduction: Cerebral ischemia occurs when blood flow drops below 20% of normal flow, leading to a reduced supply of oxygen and glucose to the brain, which further affects the disorder of ionic homeostasis, ATP synthesis, glutamate release, and excitotoxicity, which ultimately results in ischemic neuronal damage. Another mechanism that plays an important role in the pathogenesis of cerebral ischemia is the disturbance of oxidative balance, which manifests itself through increased release of free radicals (FR) and oxidative stress. In ischemic tissue, it is of utmost importance to establish circulation, but reperfusion leads to even greater free radical production, exhaustion of antioxidative capacity and further oxidative damage. Potential FR source in ischemia and brain reperfusion is NADPH oxidase family (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase), whose main physiological function is superoxide anion production. Expression of NOX2 (gp91^{phox}) protein was detected in CNS cells (neurons, astrocytes, microglia), which in association with p22^{phox}, GTP-Rac, p47^{phox}, p67^{phox} and p40^{phox}, produces a superoxide anion. NOX4 is the most common isoform at the level of the vascular network. As NOX2 and NOX4 could be a significant source of FR after brain ischemia, these isoforms represent potential therapeutic targets. In addition to oxidative stress, ischemic/reperfusion (I/R) injury also triggers the apoptosis and distorts the autophagy. The role of autophagy in brain ischemia has not yet been clarified. Recent studies focused on the prevention of cardiovascular and cerebrovascular diseases have been researching the impact of vitamin D. It has been shown that the reduced serum concentration of vitamin D is associated with an increased risk of ischemic stroke, as well as with exacerbation of ischemic damage, more severe functional recovery, and cognitive impairment. Calcitriol exhibits effects in the body through the vitamin D (VDR) nuclear receptor, which is present in the brain in both neurons and glial cells. The role and mechanism of vitamin D in cerebral ischemia have not yet been fully clarified.

Aims: To investigate the effects of vitamin D pretreatment on the parameters of oxidative stress, apoptosis, autophagy, and the representation of individual central nervous cells using appropriate markers in the prefrontal cortex and hippocampus of gerbils exposed to 10 minutes of transient global brain ischemia and reperfusion on day one, three, or seven.

Material and methods: In the experiment, we used male gerbils - *Meriones unguiculatus*, divided into seven groups. In the control group (n = 16), the animals were subjected to surgical intervention without causing ischemia. Forty-eight animals underwent a process of ischemia for 10 minutes, after which they were divided into three experimental groups. The first group (n=16) was exposed to reperfusion for one day (I/R 1d), the second (n=16) for 3 days (I/R 3d) and the third (n=16) seven days (I/R 7d). The other 48 animals were treated with vitamin D seven days before undergoing a process of ischemia. These animals were then divided into three groups depending on the duration of reperfusion. In the first group (n=16), reperfusion lasted one day (vitD+I/R 1d), in the second (n=16) three days (vitD+I/R 3d) and in the third (n=16) (vitD+I/R7d). The active form of vitamin D (1,25-(OH)₂D₃) was administered intraperitoneally (*i.p.*) at a dose of 1µg/kg daily for seven days. Transient global ischemia was obtained by placing clips on both common carotid arteries for 10 minutes, after which the clips were removed and continued with reperfusion for one, three or seven days. The amount of superoxide anion, sulfhydryl groups, reduced glutathione and malndialdehyde, as well as the activity of enzymes (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and gamma glutamyl cysteine ligase) were determined by using spectrophotometry. The expression of the gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, NOX4, SOD1, SOD2, caspase 3 (Cas3), apoptosis inducing factor (AIF), beclin 1, LC3, p62, NeuN, GFAP, Iba1, PV and β-actin proteins will be determined by Western Blot technique. Representation of neurons (neuron-specific nuclear protein, NeuN), interneurons (parvalbumin positive neurons, PV), astrocytes (glial fibrillary acidic protein, GFAP), and microglia (ionized calcium-binding adapter protein, Iba1) were analyzed by immunohistochemistry.

Results: The results of this study suggest that ten-minute transient brain ischemia and reperfusion for one, three or seven days lead to an increase in MDA levels in the cortex,

while in the hippocampus the values of this parameter were elevated after the first and the seventh day of reperfusion. Pretreatment with vitamin D influenced the preservation of MDA control levels in both examined structures of the gerbils subjected to the I/R procedure. The level of superoxide anion was elevated in I/R 1d and I/R 3d groups compared to the control in both cortex and hippocampus. Vitamin D preserved control values of superoxide anion in all groups except in the cortex after the first day of reperfusion, where we observed an increase in the amount of superoxide anion, but this increase was significantly lower compared to I/R 1d. The levels of sulfhydryl groups were lower in all I/R experimental groups relative to the control group. Vitamin D affected the recovery of the level of SH groups in the cortex three days after the reperfusion and in the hippocampus after the seventh day. In the cortex, the reduced glutathione concentration (GSH) was significantly lower on the first day after ischemia in both groups. In I/R groups, the GSH level returned to control value on the third day of reperfusion, while in vitamin D (vitD) pretreated groups recovery and significant increase in the level of GSH were observed on the seventh day of reperfusion. In the hippocampus there was significantly higher level of GSH compared to the control group observed in the vitD + I/R 3d group, while in all groups pretreated with vitamin D level of the GSH was significantly higher compared to the corresponding I/R group. The activity of GR didn't change in the cortex of I/R groups, while in the hippocampus the activity was significantly higher than in the control group. In vitD pretreated group of animals, an increase in the activity of this enzyme was seen in comparison to the control and corresponding I/R groups. This change was present in both examined structures. In the cortex and in the hippocampus, GPx activity was reduced in comparison to the control and selective vitD pretreated groups. In the hippocampus of the vitD+I/R 1d group, there was a significant reduction in GPx activity compared to the control. The activity of γ GCL was elevated in all vitD groups compared to the corresponding I/R groups in both examined structures. In the hippocampus, of all I/R groups, the decrease in the activity of this enzyme was compared to the control. The activity of SOD in the cortex of I/R 3d, I/R 7d, vitD+I/R 3d and vitD+I/R 7d group was not significantly altered, while its activity was observed to be higher in the hippocampus, both compared to the control. Expression of SOD1 was reduced in the I/R 1d group; in the subsequent phases, the expression was returned to the control values. In the hippocampus of all I/R

groups, expression of SOD1 was significantly lower compared to the control. In both structures on the third day of reperfusion vitD significantly increased SOD1 expression compared to the control, but on the first and the seventh day, it was significantly lower. The expression of SOD2 was significantly lower in the hippocampus in all experimental groups compared to the control, while in the cortex of vitD+I/R 1d and I/R 3d group it maintained control values. The expression of gp91^{phox} was higher in all I/R groups compared to the control, while it was significantly lower in the corresponding vitD groups. In the hippocampus, the expression of gp91^{phox} in the I/R 1d and I/R 7d group was also significantly higher, while in the I/R 3d group it was significantly lower comparing to the control. In all I/R groups, expression was significantly higher in comparison with vitD pretreated groups. In the cortex, the expression of NOX4 was elevated on the third day of reperfusion, on the seventh day in the I/R group was below the control values, and in the vitD group it returned to the control value. In the hippocampal region, the expression of NOX4 was reduced in I/R 1d, I/R 3d, vitD+I/R 3d and vitD+I/R 7d group in comparison to the control. In the cortex, expression of p22^{phox} was elevated after the first day of reperfusion; after the third day it had the level of the control, and on the seventh day it had lower expression in the I/R group, and elevated expression in the vitD group compared to the control. In the hippocampus, expression of p22^{phox} was elevated in I/R 1d, whereas in all other experimental groups it was lower compared to the control group. In the cortex, expression of p47^{phox} was lower in all I/R groups compared to the control and the corresponding vitD group. In vitD+I/R 1d expression was higher, while in vitD+I/R 7d was lower compared to the control. In the hippocampus, the expression of p47^{phox} was lower in all groups except in the I/R 1d group. In the cortex, expression of p67^{phox} was lower in I/R 3d and I/R 7d group compared to the control, while in the hippocampus it was higher but only in the I/R 7d group. The animals pretreated with vitamin D on the first day of reperfusion expressed higher levels of p67^{phox} compared to the control group in both examined structures. The expression of AIF protein in the cortex was lower in I/R1d, I/R7d and vitD+I/R7d group compared to the control, while in groups where reperfusion lasted three days the expression was elevated compared to the control. In the hippocampal region, the expression of this protein was reduced in all I/R groups relative to control. In the cortex, expression of Cas3 was reduced in comparison to control after the first day of

reperfusion, and elevated after the third. In the hippocampus, the expression was lower in I/R 3d group compared to the control. In the cortex, the expression of beclin 1 was decreased relative to control after the first day of reperfusion, and elevated after the third. In the hippocampus, the expression of beclin 1 was elevated in vitD+I/R 1d and vitD+I/R 3d group in relation to the control and the I/R group. The expression of LC3 in the cortex was significantly lower in all groups except in the I/R 7d group compared to control. In the hippocampus of vitD+I/R 1d group, the expression of LC3 was significantly lower, while in the other vitD groups and the I/R 7d group was elevated compared to the control. The expression of p62 was notably decreased in the cortex of all groups compared to the control, while in the hippocampus this trend was present in all groups except in the vitD+I/R 1d group. The expression of NeuN, as well as the number of neurons in both examined structures dropped after three days of I/R, while in vitamin D groups this decline was observed on the seventh day of reperfusion. Vitamin D had a structurally specific effect on PV+ interneurons. In the cortex, its effect was virtually absent, while in the hippocampus it maintained control levels or it increased expression of PV depending on the reperfusion phase. Vitamin D accelerated the increase in expression of GFAP and the number of GFAP+ cells in both structures after I/R injuries and it also increased the expression of Iba1 markers. In both investigated structures, VDR clearance was elevated in the vitD+I/R 1d group comparing to the control group and I/R 1d group. In other experimental groups, the expression of VDR was significantly lower than in the control group, but in all vitD treated groups it was significantly higher in comparison to the corresponding I/R groups.

Conclusions: The results of this study have shown that ten-minute global transient brain ischemia after one, three or seven days of reperfusion results in oxidative stress, a change in the expression of NOX2 and NOX4 and the occurrence of the autophagy and apoptosis process. More importantly, this study has shown that supplements of vitamin D3 before I/R reduce oxidative stress. In the case of NOX2 and NOX4, the intake of vitamin D3 had a different effect depending on the brain structure and duration of reperfusion. However, this study did not detect the effect of vitamin D3 on proteins of apoptosis and autophagy, except in the case of Beclin 1. Vitamin D additionally delayed the death of neurons, prevented PV+ cells from dying in the hippocampus. Vitamin D has shown a protective effect on the survival of astrocytes in the conditions of transient

global ischemia and may have contributed to the reactivity of astrocytes that provide conditions for the recovery and regeneration of tissue. It has also affected the increased expression of microglia marker late after ischemia, which has a protective effect after ischemic brain injury. Increased VDR expression after the first day of reperfusion in animals pretreated with vitamin D3 in I/R indicates that the supplementation makes sense regardless of the initial level of vitamin D.

Key words: Brain ischemia, vitamin D3, NADPH oxidase, antioxidant enzymes, free radicals, gerbils

Research area: Medicine

Research field: Neuroscience

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Osobine moždanog tkiva i uticaj ishemije-reperfuzije.....	1
1.1.1 Mehanizmi koji leže u osnovi ishemijsko-reperfuzionog oštećenja.....	2
1.1.2 Uticaj ishemije i reperfuzije na sintezu slobodnih radikala i nastanak oksidativnog stresa	4
1.1.3 Mehanizmi ćelijske smrti - apoptoza i autofagija.....	12
1.2 Vitamin D	15
1.2.1 Sinteza i metabolizam vitamin D.....	16
1.2.3 Uloge vitamina D	19
1.3 Animalni eksperimentalni model moždane ishemije.....	24
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	27
3. MATERIJAL I METODE	28
3.1 Eksperimentalne životinje	28
3.2 Eksperimentalne grupe	28
3.3 Tretiranje životinja	28
3.4 Izolacija struktura za biohemijske analize.....	29
3.5 Biohemijske analize.....	29
3.5.1 Merenje sadržaja proteina.....	30
3.5.2 Koncentracija malonildialdehid - MDA	30
3.5.3 Koncentracija superoksidnog anjona - O ₂ ⁻	30

3.5.4	Koncentracija sulfhidrilnih grupa - SH grupa	30
3.5.5	Određivanje količine redukovanoG glutationa - GSH	31
3.5.6	Aktivnost enzima superoksid dizmutaze - SOD	31
3.5.7	Aktivnost enzima glutatjon peroksidaze, glutatjon reduktaze i gama glutamil cistein sintetaze.....	31
3.6	Određivanje ekspresije proteina tehnikom Western blot.....	31
3.7	Ispitivanje morfoloških promena metodom transmisione elektronske mikroskopije	32
3.8	Priprema uzoraka za imunohistohemijsku analizu	33
3.9	Statistička analiza	33
4.	REZULTATI	34
4.1	Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na pokazatelje oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta u korteksu i hipokampusu džerbila	34
4.1.1	Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na nivo MDA i O ₂ ⁻	34
4.1.2	Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na koncentraciju sulfhidrilnih grupa (SH)	37
4.1.3	Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na nivo redukovanoG glutationa i aktivnost enzima glutatjon reduktaze, glutatjon peroksidaze i gama glutamin-cistein ligaze.....	39
4.1.4	Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ukupnu aktivnost superoksid dizmutaze (SOD) i ekspresiju SOD1 i SOD2	45

4.1.5 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ekspresiju NADPH oksidaze.....	50
4.2 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na pokazatelje apoptoze i autofagije u korteksu i hipokampusu džerbila.....	58
4.2.1 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ekspresiju kaspaze 3 i faktora indukcije apoptoze (AIF).....	58
4.2.2 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ekspresiju beklina 1, p62 i LC3 proteina	61
4.2.3 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ultrastrukturne promene u mozgu džerbila	66
4.3 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na zastupljenost neurona, astrocita i miktroglije u korteksu i hipokampusu džerbila	69
4.3.1 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ekspresiju NeuN i broj NeuN+ neurona u korteksu i hipokampusu džerbila.....	69
4.3.2 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ekspresiju parvalbumina i broj PV+ pozitivnih neurona u korteksu i hipokampusu džerbila.....	74
4.3.3 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ekspresiju glijalnog kiselog fibrilarnog proteina (GFAP) i broj GFAP+ ćelija u korteksu i hipokampusu džerbila	78

4.3.4 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ekspresiju jonizovanog kalcijum-vezujućeg adapterskog proteina (Iba 1) i broj Iba+ ćelija u korteksu i hipokampusu džerbila	82
4.4 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ekspresiju VDR.....	87
5. DISKUSIJA	89
6. ZAKLJUČCI	113
7. LITERATURA	115

1. UVOD

1.1 Osobine moždanog tkiva i uticaj ishemije-reperfizije

Mozak odrasle osobe je izuzetno metabolički i energetski zahtevan organ. On čini samo 2% ukupne telesne mase (1,5kg), a namenjeno mu je 15% minutnog volumena srca. Krv se do njega doprema putem prednjeg i zadnjeg sliva, odnosno kroz dve zajedničke karotidne arterije i dve vertebralne arterije (Živković i sar., 2000). Putem krvi mozak se snabdeva glukozom i kiseonikom. Na nivou čitavog organizma mozak troši oko 20% kiseonika i 25% glukoze, što na dnevnom nivou iznosi oko 150g glukoze, odnosno 72l kiseonika. Oksidacijom ove količine glukoze obezbeđuje se energija za održavanje akcionog i bazalnog metabolizma (Živković i sar., 2000, Atvel i Laughlin, 2001). Deo energije se ulaže u održavanje jonskog gradijenta, zatim preuzimanje i recikliranje neurotransmitera i za održavanje bazalnog metabolizma i vijabilnosti ćelija. S obzirom na to da mozak nema značajan skladišteni kapacitet bilo kakvo ometanje cirkulacije smanjuje dotok kiseonika i glukoze i tako narušava homeostazu moždanog tkiva (Živković i sar., 2000).

Termin ishemija (ischaemia, ae od grč. ἴσχειν = ishein: zaustaviti и αἷμα = haima: krv) označava nedovoljan ili potpuni prekid dotoka krvi u tkivo koji nastaje kao posledica opstrukcije arterije. Prekid cirkulacije u moždanom tkivu dovodi do ishemične bolesti mozga (apopleksija cerebri, ishemični moždani udar, šlog, infarkt mozga) ugrožavajući metaboličke potrebe ćelija centralnog nervnog sistema. U zavisnosti od stepena opstrukcije u protoku krvi ishemija može biti kompletna, kada nastupi potpuni prekid dotoka krvi ili nekompletna kada je protok smanjen za 60% u odnosu na normalan protok krvi. Takođe, ishemija može biti globalna ili fokalna u zavisnosti od uzročnika koji je do opstrukcije protoka doveo. Tako su uzročnici globalne ishemije prekid rada srca, bolest perifernih krvnih sudova ili sistemska hipotenzije, dok su trombi ili embolusi uzročnici fokalne zone ishemije. Prekid cirkulacije u trajanju od 10 sekundi utiče na poremećaj svesti, nakon 20 sekundi dolazi do gubitka spontane električne aktivnosti, poremećaj metabolizma nastupa nakon 30 sekundi. Svega 1 minut je dovoljan da nastupi poremećaj na nivou neurona. Daljim izlaganjem uslovima ishemije dolazi do strukturnih promena na ćelijskom nivou. U ishemijom zahvaćenom tkivu od izuzetne je

važnosti što ranije uspostaviti cirkulaciju, međutim ponovno uvođenje kiseonika u prethodno povređeno tkivo nosi određen stepen rizika (Kalogeris i sar., 2012). Takođe, može doći do pojave *no reflow* fenomena, koji označava da u kapilarima u kojima je došlo do prekida cirkulacije, nakon ponovnog uspostavljanja krvotoka cirkulacija ne obnavlja (Bremlett i Donald, 2004).

Sa epidemiološkog aspekta moždani udar predstavlja veliki problem modernog doba. Naime, moždani udar predstavlja drugi vodeći uzrok smrti u svetu (Svetska zdravstvena organizacija- SZO). Procenjeno je da je na godišnjem nivou 4,7 miliona smrtnih ishoda posledica moždanog udara, dok svake godine oko 700.000 ljudi podlegne prvoj ili rekurentnoj epizodi moždanog udara. Takođe, on je i jedan je od najčešćih uzroka teškog i dugotrajnog invaliditeta (Adams i sar., 2004) ostavljajući veliki teret na zdravstvenom, socijalnom i ekonomskom nivou (Bramlett i Dalton, 2004).

1.1.1 Mehanizmi koji leže u osnovi ishemijsko-reperfuzionog oštećenja

Kada protok krvi opadne ispod 20% normalnog protoka dolazi do smanjenog dotoka kiseonika u mozak uzrokujući da ćelije pogođene ishemijom pređu sa aerobnog na anaeroban metabolizam kako bi proizvele ATP (Kalogeris i sar., 2012). Ovo dovodi do akumulacije laktata, protona i nikotinamin adenin dinukleotida (NAD) što sve zajedno uzrokuje smanjenje pH u ćeliji. U pokušaju da smanji nakupljanje H^+ jona i da povrati pH na normalan nivo ćelija angažuje Na^+/H^+ pumpu što dovodi do citoplazmatske akumulacije Na^+ . Tada se pokreće zamena jona Na^+ za jone Ca^{2+} pomoću plazmalemalne Na^+/Ca^{2+} pumpe što dovodi do nakupljanja Ca^{2+} u citosolu. Takođe, u toku ishemije i reperfuzije dolazi do oštećenja endoplazmatskog retikuluma (ER) što utiče na povećani efluks Ca^{2+} i smanjeno preuzimanje u ER pomoću sarkoplazmatsko-endoplazmatske Ca^{2+} ATP-aze (engl, *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*, SERCA) (Baines i sar., 2009a,b; Baines i sar., 2010; Murphy i Steenbergen, 2008; Sanada i sar., 2011; Talukder i sar.,2009). Reperfuzija dovodi do još većeg nakupljanja Ca^{2+} u citoplazmi. Jedan od načina da se ćelija izbori sa citosolnom akumulacijom Ca^{2+} jeste da ga transportuje u mitohondrije. Međutim ukoliko se previše Ca^{2+} uvede u mitohondrije može doći do aktivacije odgovora mitohondrijalne permeabilne pore (engl, *mitochondrial permeability transition pore*, MTP) što vodi

disfunkciji mitohondrija (Di Lisa i sar., 2009; Ong i Gustafsson, 2012). Zatim, Ca^{2+} u citosolu može aktivirati Ca^{2+} /kalmodulin zavisne protein kinaze i kalpaine dovodeći do destrukcije proteina citoskeleta, ER, mitohondrija. Pored toga, intracelularni Ca^{2+} utiče na generisanje kompleksa kalcijum fosfata koji se vezuje za proteinske komplekse, inflamazome, čime se povećava produkcija citokina i aktivira nuklearni faktor kappa beta (NF- κ B) dovodeći do citokinske oluje. Sve od navedenog može dovesti do smrti ćelije kao posledice I/R povrede (Kalogeris i sar., 2012).

Mitohondrijalna disfunkcija nastala kao posledica I/R oštećenja može dovesti do dalje progresije patoloških promena. Naime, kao posledica nedostatka kiseonika tokom ishemije ATP sintaza prestaje sa produkcijom ATP-a, a kako bi očuvala potencijal mitohondrijalne membrane počinje da radi u suprotnom smeru, tj. vrši hidrolizu preostalog ATP-a. Na ovaj način rezerve ATP-a brzo opadaju po samom nastanku ishemije (Baines i sar., 2009a,b). Pored toga, u ishemijom pogođenom srčanom mišiću prestaje i oksidacija masnih kiselina, tako da se one u ćeliji nagomilavaju. Ovo može dovesti do produkcije inflamatornih metabolita arahidonske kiseline i otvaranja MPT pore na unutrašnjoj membrani mitohondrija. MPT pora je velika i dozvoljava H^+ jonima da se iz međumembranskog prostora vrate u mitosol narušavajući na taj način potencijal mitohondrijalne membrane. Takođe, sa propuštanjem H^+ jona nestaje gorivo za ATP sintazu te ona biva inhibirana i smanjuje se produkcija ATP-a. Prateći osmotski gradijent voda ulazi u mitohondriju koja otiče i puca (Baines, 2010; Halestrap, 2010).

Novija istraživanja skreću pažnju i na procese kojima su mitohondrije sklone, a to su fisija (deljenje) i fuzija. Naime, mitohondrije formiraju tubularne interkomunikacijske mreže kojima se povezuju sa citoskeletom, a zatim se ili dele ili fuzionišu. Nebalansirani odnos ova dva procesa daje ili velike mreže povezanih mitohondrija (dominantna fuzija) ili premale fragmentisane mitohondrije (dominantna fisija). U uslovima I/R dolazi do aktivacije procesa fisije koji je nezaobilazan korak u spoljašnjem putu aktivacije apoptoze (Chen i Knowlton, 2010).

1.1.2 Uticaj ishemije i reperfuzije na sintezu slobodnih radikala i nastanak oksidativnog stresa

Tradicionalna definicija oksidativnog stresa ističe da on nastaje kao posledica disbalansa između ćelijskih nivoa prooksidanasa i antioksidanasa dovodeći do nekontrolisane produkcije slobodnih kiseoničnih radikala (engl, *reactive oxygen species*, ROS). Međutim, ova definicija se vremenom menjala s obzirom na to da terapijski tretmani preparatima koji su usmereni na smanjenje produkcije i eliminaciju slobodnih radikala nisu imali velike učinke i da su se sticala nova saznanja o oksidativnom stresu i redoks signalingu u ćelijama odnosno da je prepoznata modulatorna uloga slobodnih kiseoničnih radikala u ćelijskoj fiziologiji. Danas se smatra da oksidativni stres uključuje tri komponente: (1) indirektne efekte oksidanasa, pogotovo neradikalnih, kao što je vodonik peroksid (H_2O_2) koji može biti uzrok poremećaja prenosa signala u ćeliji i propadanja kontrolnih mehanizama osetljivih na redoks status tiolnih grupa; (2) modulatorne efekte koje ostvaruje na prenos signala u ćeliji putem kovalentnih, oksidativnih ili nitroznih modifikacija ključnih regulatornih proteina; (3) direktno dejstvo kojim oštećuje ćelijske komponente (lipide, ugljene hidrate, DNK) (Go i sar., 2010; Lima i sar., 2010). Koji je od ovih mehanizama je najznačajniji u I/R povredi nije jasno, ali se zna da u patogenezi moždane ishemije važno mesto ima povećano oslobađanje slobodnih radikala odnosno nastanak oksidativnog stresa (Kalogeris i sar., 2012). Ako se poredi sa drugim organima (srce, bubreg, jetra, pluća) mozak ima znatno niži antioksidativni kapacitet, te i manje količine enzima koji kontrolišu količinu slobodnih radikala u ćeliji, kao što su SOD, katalaze, GPx, hem oksigenaze, citohrom c oksidaze. Ovo dodatno utiče na smanjenu produkciju ATP-a i generisanja superoksidnog anjona na elektron transportnom lancu. Visok stepen polinezasićenih masnih kiselina čini da tkivo mozga bude još podložnije oksidativnom oštećenju (Adibhatha i Hatcher, 2010).

Inicijalni kiseonični radikal je superoksidni anjon, koji nastaje kao rezultat univalentne redukcije molekularnog kiseonika pod uticajem različitih citoplazmatskih i membranskih enzima, kao i na nivou elektron transportnog lanca u mitohondrijama. Svi drugi slobodni radikali proizlaze iz dizmutacije ili interakcije sa drugim molekulima. Superoksidni anjon može direktno oksidovati različite biomolekule i inaktivirati enzime

koji sadrže gvožđe-sumpor (FeS) centre. Bez obzira na njegovu reaktivnost ne smatra se mnogo toksičnim *in vivo* jer brzo i spontano disosuje u H_2O_2 . Međutim superoksidni anjon pri niskoj pH vrednosti može lako i brzo da se prevede u konjugovanu kiselinu – hidroperoksilni radikal, koji ima nešto potentnije osobine. Konačno, superosidni anjon može reagovati sa azotom gradeći peroksinitrit anjon, koji je podložan protonovanju čime nastaje visoko citotoksično jedinjenje – peroksinitrozna kiselina. Sledeći kiseonični slobodni radikal je H_2O_2 koji je manje reaktivan od superoksidnog anjona, ali je široko zastupljen na ćelijskim membranama te se može ponašati kao sekundarni glasnik i modulator prenosa signala. H_2O_2 u Fentonovoj reakciji učestvuje u sintezi izuzetno reaktivnog kiseoničnog radikala – hidroksilnog radikala (Kalogeris i sar., 2012).

U zdravoj ćeliji mitohondrija je najveći proizvođač superoksidnog anjona. Više od 90% kiseonika koji uđe u ćeliju se redukuje do vode putem mitohondrijalnog elektron transportnog lanca, a svega 1-2% tog kiseonika se prevede u superoksidni anjon. Naime, u elektron transportnom lancu dolazi do “elektronskog curenja” u mitosol na nivou kompleksa 1 (NADH - koenzim Q reduktaza) i kompleksa 3 (koenzim Q - citohrom c reduktaza). Međutim u I/R uslovima dolazi i do povećanja produkcije slobodnih radikala i smanjenja mitohondrijalnog endogenog antioksidativnog kapaciteta. Osim mitohondrija u produkciji slobodnih radikala učestvuju i ćelijski enzimi, kao što su ksantin oksidaza, citohrom P450, azot oksid sintaza (engl, *nitric oxide synthase*, NOS) i NADPH oksidaza (Kvietys i Granger, 2012).

Precizna uloga ovih enzima u produkciji superoksidnog anjona u I/R povredi nije utvrđena s obzirom da predominantan izvor može varirati u odnosu na vrstu, tkivo izloženo I/R, ili eksperimentalni protokol. Međutim, Abramov i sar. (2007) su proučavanjem ROS indukovane apoptoze u kulturi neurona izloženih anoksiji i reoksigenaciji došli do sekvence formiranja ROS. Na samom početku, za vreme hipoksije, dolazi do prolaznog povećanja produkcije superoksidnog anjona od strane mitohondrija, zatim se nastavlja druga faza gde je glavni izvor ksantin oksidaza nakon koje, na pragu otpočinjanja reoksigenacije, sledi treća faza u kojoj se generisanje ROS vrši na nivou NADPH oksidaze. U ishemijom zahvaćenom tkivu od izuzetne je važnosti što ranije uspostaviti cirkulaciju, međutim reperfuzija dovodi do još veće produkcije

slobodnih radikala, iscrpljivanja antioksidativnog kapaciteta ćelija i daljeg oksidativnog oštećenja (Kalogeris i sar., 2012). Superoksidni radikali stvoreni tokom reperfuzije mogu oksidovati različite tipove molekula u ćeliji, dovodeći do ćelijske disfunkcije (oksidativni paradoks) (Kalogeris i sar., 2012).

Slobodni radikali generisani u I/R uslovima na tri načina dovode do propadanja ćelija. Pre svega, oni dovode do narušavanja makromolekula ćelije (membranski lipidi, protein, DNK), zatim smanjuju nivo dostupnog azot monoksida koji ima važnu ulogu na nivou endotela krvnog suda (dilatacija krvnog suda, smanjenje agregacije i adhezije trombocita, prevencija adhezije leukocita za zid krvnog suda, ulogu u procesu angiogeneze) i utiču na prenos signala u ćeliji menjajući redoks stanje ćelije ili vršeći direktno dejstvo na specifični signalni/efektorski sistem (Kalogeris i sar., 2012).

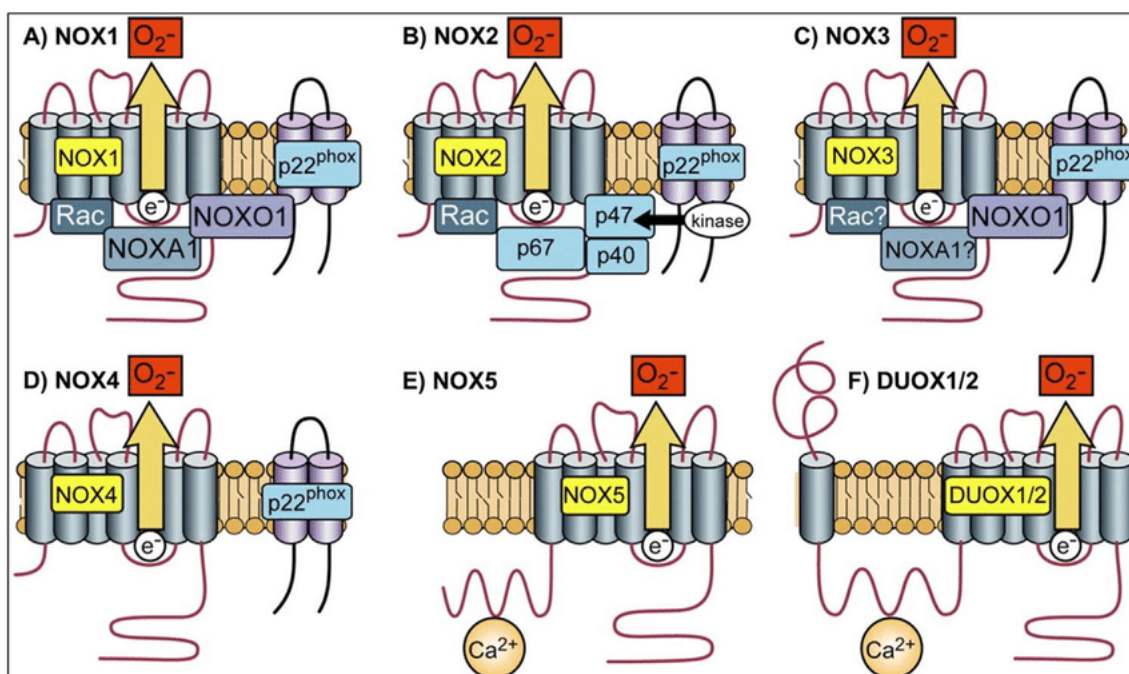
1.1.2.1 Enzimaska familija NADPH oksidaza

Potencijalni izvor slobodnih radikala u I/R povredi mozga predstavljaju enzimi familije NADPH oksidaza (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaze). To je familija membranskih enzima čija je funkcija stvaranje superoksidnog anjona, prenosom jednog elektrona na molekularni kiseonik. Tako da je biološka funkcija ove enzimske familije produkcija slobodnih radikala (Bedard i Krause, 2007).

Za otkrivanje NADPH oksidaze zaslužni su fagociti i oksidativni prasak. Naime, u prvoj polovini 20. veka za postojanje NADPH oksidaze se nije znalo, ali je bio opisan proces respiratornog praska. Zatim je opisano da je ovaj proces energetski zavisian i da u njemu kao proizvod nastaje H_2O_2 . Dalje se spekulisalo da li u njemu učestvuje NADH ili NADPH. Prva otkrića o NADPH oksidazi nastala su sredinom 20. veka. Rossi i Zatti su (1996) prepostavili da je za oksidativni prasak odgovorna NADPH oksidaza. Već sedamdesetih godina, Klebanoff (1970) je demonstrirao doprinos mijeloperoksidaze u respiratornom prasku zavisnom od antimikrobne aktivnosti fagocita. Par godina kasnije Babior i sar. (1973) su pokazali da je primarni produkt respiratornog praska superoksidni anjon (O_2^-), a ne vodonik peroksid. Sledeći izazov je bio otkrivanje proteina koji su uključeni u produkciju O_2^- . Prvo je otkrivena katalitička subjedinicina NADPH oksidaze, gp91^{phox}. Ubrzo je postalo jasno da ona nije jedina komponenta ovog enzima te su nizom eksperimenata otkrivene i p22^{phox}, zatim organizatorska p47^{phox},

aktivišuća p67^{phox}, Rac-GTP-aza i mala modulišuća p40^{phox}. Sekvenciranjem humanog genoma otkrivene su izoforme ovog enzima. Danas je poznato da familija NADPH oksidaza obuhvata 7 članova NOX1 do NOX5, DUOX1 i 2 (Royer-Pokora i sar., 1986; Teahan i sar., 1987; Dinaver i sar., 1987; Nunoi i sar., 1988; Volpp i sar., 1988; Abo i sar., 1991; Wientjes i sar., 1993).

Enzimi NOX familije su transmembranski proteini koji učestvuju u transportu elektrona kroz biološke membrane redukujući molekularni kiseonik do superoksida. S obzirom na njihovu visoko prezerviranu funkciju prisutne su i konzervirane strukturne karakteristike NOX enzima koje su zajedničke za sve članove familije. Krećući se od COOH kraja, ovi konzervirane strukturne karakteristike obuhvataju: 1) NADPH vezujuće mesto na samom COOH kraju; 2) FAD vezujući domen; 3) šest konzerviranih transmembranskih domena i 4) četiri visoko konzervirana hem vezujuća histidina, dva na trećem i dva na petom transmembranskom domenu. U DUOX proteinima histidini su na četvrtom i šestom transmembranskom domenu. Dodatne karakteristike kao što su Ca²⁺ vezujući domen - EF ručice, NH2 terminalni domeni i peroksidaza homologi domeni, su obeležja pojedinačnih članova familije (Bedard i Krause, 2007).



Slika 1. Šematski prikaz strukture različitih izoformi NADPH oksidaze. Preuzeto iz Bedard i Krause., 2007, *Physiol Rev* 87: 245–313.

Ekspresija NADPH oksidaza je ubikvitarna kod sisara, ali pojedine NOX izoforme imaju različitu tkivnu i ćelijsku distribuciju. Tako su DUOX1 i 2 predominantno eksprimirani u epitelnim ćelijama, ali tokom patološkog stanja mogu biti eksprimirani i u drugim ćelijama (Kahles i Brandes, 2012). Tkivno zavisna distribucija je nađena kod NOX3 koji se izričito eksprimira u unutrašnjem uhu, specifičnije u vestibularnim i kohlearnim senzornim epitelnim ćelijama i Kortijevom ganglionu (Bánfi i sar., 2004). Za NOX5 se smatra da u ljudi predstavlja važan izvor ROS u ćelijama krvnih sudova. Ovaj član NOX familije nedostaje kod miševa i pacova zbog delecije gena (Fulton, 2009). Ekspresija NOX1 dominira u epitelnim, tumorskim i ćelijama glatkih mišića (Kahles i Brandes, 2012). Ekspresija NOX2 je najveća u fagocitima, ali je ovaj enzim eksprimiran i u drugim ćelijama. NOX4 je prvobino primećen u tkivu bubrega u tubularnim ćelijama, a sada se zna da je ova forma najzastupljenija u vaskularnim ćelijama (Bedard i Krause, 2007).

Pokazano je da NOX proteini imaju ulogu u regulaciji mnogih fundamentalnih fizioloških procesa, uključujući ćelijski rast, diferencijaciju, apoptozu i remodelovanje citoskeleta (Bedard i Krause, 2007). Pored toga ROS stvoreni putem NADPH oksidaze učestvuju u odbrani domaćina i deluju anti-inflamatorno (Bedard i Krause, 2007). Ovo sve postižu zahvaljujući uticaju proizvedenih ROS na prenos signala u ćelijama. Naime, ROS porekla familije NADPH oksidaze utiču na redoks stanje cisteinskih rezudua i tako regulišu ćelijske funkcije. Najbolje proučen primer je protein fosfataza koja putem kovalentnih modifikacija utiče na aktivnost brojnih enzima regulišući ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju, metabolizam, motilitet i preživljavanje. Smanjujući fosfataznu aktivnost ROS utiču na fosforilaciju tirozina, a samim tim i na signalnu transdukciju. Dalje, stvoreni ROS utiču i na aktivnost MAP kinaze, mada tačan mehanizam još uvek nije poznat. Superoksidni anjon koji nastaje pod uticajem NOX enzima reguliše joske kanale za K^+ , kao i plazmalemalne i unutarćelijske kanale za Ca^{2+} i utiče na ekspresiju gena za faktor nekroze tumora alfa (engl, *tumor necrosis factor*, TNF- α), tkivni faktor rasta beta (engl, *tissue growth factor beta*, TGF- β) i tkivni aktivator plazminogena. ROS porekla od NADPH oksidaze su često povezivani i sa pokretanjem apoptoze, međutim postoje studije koje govore u prilog antiapoptotskoj aktivnosti ovih molekula. Pretpostavljeno je da se antiapoptotska aktivnost ostvaruje uticajem na NF- κ B i Akt/ASK1 put kao i da je superoksidni anjon inhibitor FAS

zavisne ćelijske smrti. Nalazi različitih uticaja ROS na proces apoptoze u pojedinim istraživanjima objašnjavaju se različitom dužinom trajanja ROS signala, kao i njegovom jačinom, zatim subćelijskom lokalizacijom NOX izoformi i uticajem na redoks stanje niza ciljnih proteina.

1.1.2.2 Uloga NADPH oksidaza u centralnom nervnom sistemu

U ćelijama CNS-a je detektovana ekspresija NOX1, NOX2 i NOX4, međutim za sada nema podataka od ulogama NOX3, NOX5 i DUOX1 i 2 (Chrissobolis i Farraci, 2008). U CNS-u ekspresija ovih proteina, kao i ostalih subjedinica p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} i Rac-GTP-aze je uočena u endotelnim ćelijama, pericitima, astrocitima, mikrogliji i neuronima. Imunohistohemijским metodama je otkriveno da različite subpopulacije ćelija ne ekspimiraju podjednako određenu NOX izoformu, što se pripisuje različitim ulogama koje ove ćelije obavljaju (Vallet i sar., 2005). Izgleda da u oligodendrocitima nema ekspresije NOX proteina, ali ove ćelije odgovaraju na ROS porekla NADPH oksidaze, koji su produkovni u drugim ćelijama CNS-a. Upravo tako ROS proizvedeni u hipokampalnim neuronima usled dugotrajne potencijacije difunduju u susedne oligodendrocite gde stimlišu kinaze koje dovode do fosforilacije mijelin baznog proteina pojačavajući mijelinizaciju (Atkins i Sweatt, 1999).

Veliki broj radova je usmeren na ispitivanje štetnog uticaja ROS na CNS, zbog specifičnosti moždanog tkiva. S obzirom da je osnovna, fundamentalna uloga NOX enzima, produkcija superoksidnog anjona jasno je da on ima svoju fiziološku ulogu u CNS-u. Kao što je ranije opisano i u CNS-u ROS porekla NOX enzima imaju ulogu signalnog molekula. Smatra se da je u neuronima NADPH oksidaza učestvuje u modulaciji neuronske aktivnosti, kogniciji i dugotrajnoj memoriji (Bedard i Krause, 2007).

Slobodni radikali produkovani od strane NADPH oksidaze su uključeni u patofiziološke mehanizme različitih bolesti CNS-a. U Alchajmerovoj, Parkinsonovoj bolesti pa i HIV demenciji ROS nastali pod delovanjem NOX enzima se smatraju izuzetno značajnim faktorom propadanja CNS-a. Takođe, se smatraju odgovornim za progresiju demijelinizacionih oboljenja. Brojna istraživanja ukazuju na učešće NOX enzima u patofiziološkim procesima koji nastaju nakon ishemijskog moždanog udara. Pokazano

je da je veličina ishemične zone znatno manja kod NOX2 *knock out*, u odnosu na divlji soj miševa. Radermacher i sar. (2013) su pokazali da je veličina infarktne zone čak za 75% manja kod NOX4 *knock out* miševa, kao i kod divljeg soja kojima je nakon ishemije intratekalno apliciran NOX4 inhibitor. Povećanje ekspresije NOX2 i NOX4 u miševa zapaženo je u toku prvih 24h nakon izlaganja ishemiji (Radermacher i sar., 2013). Svi ovi rezultati ukazuju da su NOX2 i NOX4 značajan izvor oksidativnog stresa nakon ishemije mozga i da ove izoforme mogu predstavljati potencijalne terapijske mete (Radermacher i sar., 2013).

- Karakteristike NOX2 izoforme -

Najviše proučavan član familije NADPH oksidaze je NOX2, još poznat i pod nazivom gp91^{phox} i predstavlja prototip NADPH oksidaze. Izgrađen je iz šest transmembranskih domena i oba kraja (COOH i NH₂) su uronjena u citoplazmu. Za ispoljavanje aktivnosti zahteva seriju protein-protein interakcija pre svega između NOX2 i p22^{phox} sa kojom je konstitutivno povezana. Aktivacija NOX2 pored p22^{phox} zahteva i translokaciju citosolnih faktora koja omogućava formiranje NOX2 kompleksa. Subjedinica koja je zadužena za translokaciju je citosolna p47^{phox} i ona vodi sa sobom aktivatorsku p67^{phox} i spaja je sa NOX2. Pored aktivatorske subjedinice ona dovodi i malu p40^{phox} subjedinicu do kompleksa. Na kraju Rac-GTPaza interaguje sa NOX2 putem dvostepenog mehanizma koji uključuje direktni kontakt sa NOX2 na koji se nadovezuje interakcija sa p67^{phox}. Jednom kada se formirao, kompleks postaje aktivan i generiše superoksidni anjon prebacujući elektron sa NADPH iz citosola na vanćelijski kiseonik na predhodno opisan način. Ovaj enzim je prvo opisan u fagocitima (neutrofilima i makrofagima). U mirujućim neutrofilima većina NOX2 je smeštena u sekundarnim (specifičnim) granulama i tercijskim (gelatinaznim) granulama. Po aktivaciji, odnosno stimulaciji fagocita, dolazi do translokacije NOX2 do površine i fuzije sa fagozomalnom ili plazma membranom. Ova fuzija je ključni događaj za mikrobicidnu aktivnost NOX2. Međutim, NOX2 može biti aktivirana i u granulama, bez potrebe za spajanjem sa membranom ćelije, što dovodi do produkcije ROS koji su verovatno uključeni u ćelijski prenos signala (Bedard i Krause, 2007).

NOX2 je osim u fagocitima lokalizovan i u brojnim drugim organima (timus, tanko crevo, slezina, jajnici, placenta, prostata i testis) i ćelijama (kardiomiociti, miociti skeletnih mišića, hepatocitima, endotelnim ćelijama, neuronima). Subcelularna lokalizacija NOX2 u ćelijama različitim od fagocita zavisi od specifičnosti ćelije. Tako je u hipokampalnim neuronima NOX2 lokalizovan na membranama sinaptičkih pukotina gde najverovatnije igra ulogu superoksid zavisne dugoročne potencijacije i pamćenja (Bedard i Krause, 2007).

- Karakteristike NOX4 izoforme -

NOX4 je prvobitno identifikovana u tubulanim ćelijama tkiva bubrega, da bi nakon toga usledila njena identifikacija i u brojnim drugim ćelijama, kao što su osteoklasti, glatke mišićne ćelije, ćelije hematopoeznog sistema, endotelne ćelije, fibroblasti, keratinociti i neuroni. Ovaj protein deli 39% sličnosti sa NOX2 (gp91^{phox}) i smatra se da je konstitutivno ekspimiran. Međutim, njegova ekspresija može biti podstaknuta u uslovima stresa, hipoksije, povrede karotidne arterije, zatim pod uticajem TGF- β i TNF- α , ili u odgovoru na angiotenzin II (Bedard i Krause, 2007). Subćelijska lokalizacija NOX4 varira u odnosu na tip ćelije. U ćeliji NOX4 se da nakupljanje na nivou ER, ali se pretpostavlja da je ovo posledica mesta njegove sinteze mada se ne isključuje moguća funkcionalna uloga NOX4 na nivou ER. U endotelnim i vaskularnim glatko-mišićnim ćelijama NOX4 se ekspimirira i u nukleusu. Za razliku od NOX2, NOX4 za svoju aktivnost ne zahteva citosolne subjedinice (p47^{phox}, p67^{phox} i p40^{phox}), a još uvek nije jasno da li NOX4 i Rac-GTP-aza ostvaruju direktan ili indirektan kontakt. Jedina subjedinica od koje je NOX4 zavisna jeste p22^{phox}. Specifičnost NOX4 leži u činjenici da umesto superoksidnog anjona proizvodi vodonik peroksid. Međutim, ovo ne znači da NOX4 direktno produkuje H₂O₂ već je moguće da se, s obzirom na njegovu unutarćelijsku lokalizaciju, produkovani superoksid ispušta u lumen organele gde se jako brzo prevodi u H₂O₂. Tada, nepolarni H₂O₂ difunduje kroz membrane i dolazi do vanćelijskog prostora. NOX4 je najzastupljenija izoforma na nivou vaskularne mreže. Ekspresija ovog proteina u arterijama CNS-a je veća u odnosu na krvne sudove periferije (Radermacher i sar., 2013).

1.1.3 Mehanizmi ćelijske smrti - apoptoza i autofagija

Dugo se smatralo da je ćelijska smrt u I/R povredi rezultat spoljašnjih činilaca, kao što su gubitak energetske rezervi, intervencija inflamatornih faktora, toksičnih molekula ili mehaničkih povreda ćelija, dok se glavnim modelom smrti smatrao model zadesne smrti ćelije - nekroza. Sve više je informacija o tome da naizgled slučajni i nekontrolisani događaji koji su povezani sa nekrozom, mogu u određenim okolnostima, biti uključeni u mobilizaciju i koordinaciju specifičnih signalnih molekula koji zatim utiču na sprovođenje programirane nekroze ili nekroptoze. Pored toga, uočeno je da smrt ćelije može biti pokrenuta putem signalnih molekula i odvijati se programirano kroz procese apoptoze i autofagije (Kroemer i sar., 2009). Spora progresija ćelijske smrti u zoni ishemične penumbre čini procese apoptoze i autofagije atraktivnim ciljevima za potencijalne terapije (Deng i sar., 2016). Uloga koju autofagija ima u ishemiji mozga još uvek nije razjašnjena.

1.1.3.1 Programirana ćelijska smrt - apoptoza

Apoptoza, još se naziva i programirana ćelijska smrt tip I, predstavlja evolutivno konzerviran i genetski determinisan proces (Lee i sar., 2012; Los i sar., 2002). Ona igra bitnu ulogu u očuvanju homeostaze tkiva i ima funkciju u odbrani i uklanjanju oštećenih ćelija. Ovo je energetski zahtevan proces, a sprovodi se putem aktivacije enzima iz klase cistein proteaza – kaspaza. Ovi enzimi, razgrađuju osnovne ćelijske strukture uključujući i genetski materijal. Apoptotski mehanizmi smrti mogu biti pokrenuti unutrašnjim (mitohondrijalnim), i spoljašnjim (receptorskim) putem (Kroemner i sar., 2007; Whealan i sar., 2010).

Spoljašnji put aktivacije kaspaza podrazumeva aktivaciju receptora kao što su Fas, TNF- α i TNF-srodni apoptoza-indukujući ligand (engl, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*, Trail), čijom aktivacijom dolazi do trimerizacije i naknadnog regrutovanja proteina koji sadrže domen smrti – Fas asociranog proteina sa domenom smrti (engl, *Fas-associated protein with death domain*, FADD) i TNF receptor 1 asociranog proteina sa domenom smrti (engl, *TNF receptor 1 associated death domain protein*, TRADD), na receptorski kompleks. Ovaj signalni kompleks aktivira kaspazu 8 koja potom dovodi do aktivacije

kaspaze 3. Kaspaza 3 deluje kao egzekutor u ćeliji izazivajući proteolizu različitih ćelijskih proteina (Kroemner i sar., 2007; Whealan i sar., 2010).

Unutrašnji ili mitohondrijalni put apoptoze je posledica uticaja citotoksičnih medijatora kao što su UV zračenje, toksične materije, oksidativni stres i I/R. Ovi faktori doprinose depolarizaciji spoljašnje mitohondrijalne membrane, translokaciji i integraciji Bcl2 proteina u spoljašnju mitohondrijalnu membranu, čime membrana postaje permeabilna za proapoptotske proteine kao što su citohrom c, faktor pokretanja apoptoze (engl, *apoptosis inducing faktor*, AIF) Smac/DIABLO (engl, *Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*), serin proteaza Omi/HtrA2 i endonukleaza-G, koji se nalaze u međumembranskom prostoru. Oslobođeni citohrom c iz mitohondrija se vezuje za citoplazmatski protein Apaf1 (engl, *apoptotic protease-activating factor-1*) što vodi daljoj aktivaciji kaspaze 9 i kaspaze 3. Mitohondrijalni proteini Smac/DIABLO i serin proteaza Omi/HtrA2 aktiviraju kaspaze tako što sekvestiraju, odnosno razgrađuju proteine inhibitore kaspaza, dok endonukleaza G dovodi do DNK fragmentacije. AIF indukuje apoptozu na kaspaza nezavisan način i smatra se da ima ključnu ulogu u ćelijskoj smrti neurona i nekih tumorskih ćelija (Kroemner i sar., 2007; Whealan i sar., 2010). Istraživanja na *knock out* modelima su pokazala da AIF na indirektan način reguliše proces oksidativne fosforilacije, te da njegov nedostatak dovodi do disbalansa elektron transportnog lanca, pogotovo na nivou prvog kompleksa uzrokujući povećanu produkciju ROS i posledično oksidativni stres (Ishimura i sar., 2008; Polster, 2013). Tačan mehanizam uticaja AIF-a na proteine elektron transportnog lanca nije još uvek objašnjen (Polster, 2013).

Pored prethodno opisanih karakterističnih biohemijskih procesa, ćelija koje umire programiranom ćelijskom smrti, apoptozom, pokazuje i specifične morfološke promene, kao što su smanjivanje zapremine ćelije (povećavanje gustine citoplazme), piknoza jedra - kondenzacija hromatina, pupljenje ćelijske membrane, stvaranje apoptotskih tela, i fragmentaciju molekula DNK (Schulze-Osthoff i sar., 1994; Williams i sar., 1974).

1.1.3.2 Autofagija

Autofagija je glavni ćelijski mehanizam kojim se iz ćelije uklanjaju oštećene organele i proteinski agregati. Ovaj fiziološki proces je posredovan lizozomima, pomoću kojih se mogu ukloniti različite ćelijske komponente (Mizushima i Levine, 2010).

U uslovima delovanja ćelijskih stresora (izgladnjivanje, hipoksija, mitohondrijalna disfunkcija, infektivni agens) proces autofagije pomaže preživljavanje ćelije, na taj način što podstiče razgradnju organela i molekula obezbeđujući energiju i supstrate za održavanje metaboličkih procesa. Tako da je, u suštini, autofagija pre proces "preživljavanja ćelije", a ne njene smrti. Međutim, nekontrolisana autofagija će posledično uvesti ćeliju u smrt te doprineti dejstvu stresora (Gottlieb i Mentezer, 2010; He i Klionsky, 2009).

Morfološki, autofagija se karakteriše prisustvom citoplazmatskih vezikula sa dvostrukom membranom, u kojima je smešten sadržaj za razgradnju (proteini ili organele). Proces formiranja autofagnih vezikula protiče kroz tri faze: (1) inicijacije, kada dolazi do formiranja membrane oko sadržaja koji se treba ukloniti; (2) elongacije, kada se formira dvostruka membrana i nastaje autofagozom; (3) degradacije u autofagolizozomu (Gottlieb i Mentezer, 2010; He i Klionsky, 2009). Autofagolizozom nastaje spajanjem autofagozoma i lizozoma. Mikrotubuli i citoskelet ćelije pomažu da se autofagozom i lizozom sretnu. Ovde dolazi do hidrolize ćelijskog sadržaja delovanjem kiselih hidrolaza u uslovima kiselog pH u lizozomima. Autofagozomi mogu da se formiraju u bilo kom delu ćelije. U neuronima proces može započeti na nivou dendrita, aksona ili tela ćelije (Hollenbeck i sar., 1993).

Zbog svega navedenog jasno je da je za optimalno funkcionisanje ćelije neophodno da proces autofagije bude adekvatno regulisan. Glavni kontrolor i inhibitor procesa autofagije je mTOR (engl, *mammalian target of rapamicyn*). U uslovima stresa mTOR biva inhibiran, što utiče na oslobađanje ili aktivaciju protein kinaze Atg1 (engl, *autophagy-related protein*, Atg), koja zajedno sa Atg13 i Atg17 inicira formiranje fagofore. Formiranje fagofore je olakšano prisustvom kompleksa klase III fosfatidilinozitol 3 kinaze (engl, *phosphatidil inositol kinase 3*, PI3K3C) nazvanog vps34, vps15 i beclin1 koji regrutuju Atg12, Atg5 i Atg8 (engl, *light chain 3*, LC3),

ključne komponente za finalizaciju elongacije membrane i formiranje autofagozoma. Fuzija autofagozoma i lizozoma je postredovana GTPazom Rab7 i lizozomalnim membranskim proteinom (engl, *Lysosome-associated membrane protein 2*, LAMP2 (Gottlieb i Mentezer, 2010; He i Klionsky, 2009).

Proces autofagije mora biti precizno regulisan. Međutim, dešava se da nastupi blokada ili prekomerna produkcija autofagolizozoma koji se ne mogu razgraditi što uvodi ćeliju u smrt (Uchiyama i sar., 2009).

1.2 Vitamin D

Aktivni oblik vitamin D, 1,25-dihidroksi-vitamin D ($1, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$), pripada grupi stereoidnih hormona i prepoznat je i kao razvojni neurosteroid, koji igra važnu ulogu u centralnom nervnom sistemu (Eyles i sar., 2009). Mnogobrojne studije su pokazale da vitamin D učestvuje u razvoju mozga, održavanju moždanih funkcija kod odraslih osoba i štiti mozak starijih osoba (Eyles i sar., 2003; Groves i sar., 2014). Vitamin D svoje efekte ostvaruje preko receptora za vitamin D (engl, *vitamin D receptor*, VDR) delujući na nivou gena, ali i putevima koji ne uključuju prepis gena (Hausleri sar., 2011). Tačni mehanizmi putem kojih su efekti posredovani su u fazi ispitivanja.

Vitamin D se našao u fokusu istraživanja upravo zbog mnogobrojnih uloga u organizmu, ali i zbog činjenice da je na globalnom nivou prisutna insuficijencija ili deficijencija vitamina D. Referentni opseg 25-(OH) vitamina D iznosi 75-200nmol/l (30-80ng/ml). Nivoi vitamina D između 20-30ng/ml smatraju se insuficijentnim, dok vrednosti ispod 20ng/ml upućuju na deficijenciju. Intoksikacija vitaminom D se javlja kada je u cirkulaciji prisutan u količini većoj od 150ng/ml. Razlozi zbog kojih se u krvi mere koncentracije prekursora aktivnog oblika vitamina D, 25-(OH) vitamina D, a ne aktivne forme su kratak poluživot aktivne forme od oko svega par sati u odnosu na poluživot prekursora koji u krvi cirkuliše nekoliko nedelja i 1000 puta manje koncentracije aktivne forme u plazmi (izražene u pikogramima) u odnosu na koncentraciju prekursora 25-(OH) vitamina D. Zbog svega navedenog se koncentracija 25-(OH) vitamin D smatra se najboljim indikatorom statusa vitamina D. Dosadašnje studije su pokazale da je snižena koncentracija $1, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ u serumu povezana sa povećanim rizikom od kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih događaja (Zhang i

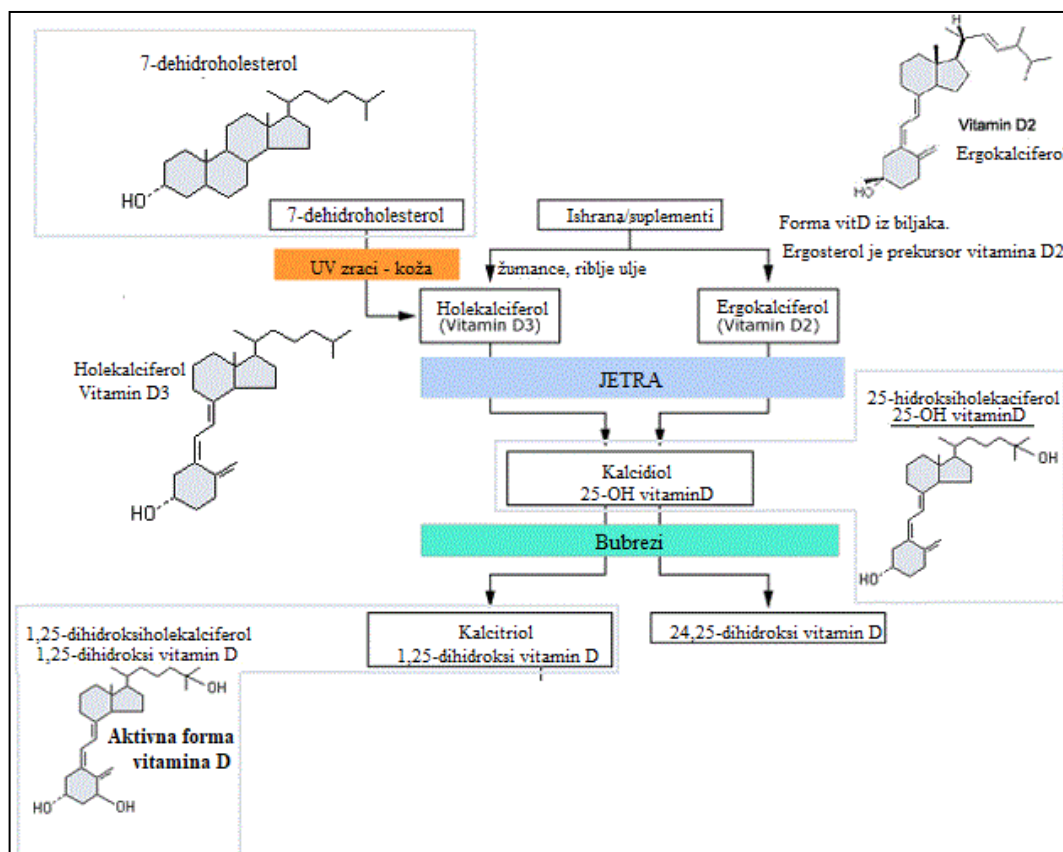
Naughton, 2010). Niske koncentracije vitamina D u vezi su sa pojavom ishemijskog moždanog udara, kao i sa pogoršanjem ishemijskog oštećenja, težim funkcionalnim oporavkom i kognitivnim disbalansom (Won i sar., 2015; Yalbuздag i sar., 2015). Takođe, istraživanja su pokazala da pretretman kalcitriolom (1, 25-(OH)₂D₃) značajno povećava sintezu neurotrofičkih faktora, modulira sintezu neurotransmitera i smanjuje ishemijskom indukovano oštećenje mozga i krvnomoždane barijere eksperimentalnih životinja (Won i sar., 2015). Yao i sar. (2015) su pokazali da je povećana ekspresija VDR povezana sa smanjenjem stepena oksidativnog oštećenja i inhibicijom procesa apoptoze i autofagije te da ima ulogu u samoodbrani i kardioprotekciji srčanog mišića izloženog ishemijsko-reperfuzionom oštećenju. Međutim, uloga i mehanizmi delovanja vitamina D u cerebralnoj ishemiji još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni (Yao i sar., 2015).

Danas postoje brojne opservacione studije koje govore u prilog hipotezi da suplementacija vitaminom D može biti protektivna u odnosu na moždani udar (Pilz i sar., 2011). Međutim, dostupno je svega par interventnih studija čiji se rezultati razlikuju. Ove razlike su verovatno posledica metodoloških ograničenja (Pilz i sar., 2011; Scragg i sar., 2017). koja uključuju različite doze vitamina D, individualne karakteristike subjekata, različit odgovor na suplementaciju, kao i procenu rezultata na osnovu stope incidencije i prevalencije ne razmatrajući težinu ishoda.

1.2.1 Sinteza i metabolizam vitamin D

Biološka sinteza vitamin D počinje u koži pod uticajem sunčeve svetlosti. Holekalciferol (vitamin D₃) je polazno jedinjenje koje se proizvodi u koži iz 7-dehidroholesterolu pri izlaganju ultraljubičastom B delu spektra sunčeve svetlosti. Pod dejstvom sunčevih zraka na kožu, 7-dehidroholesterol apsorbira ultraljubičaste B zrake i pretvara se u prekalCIFEROL, a veliki deo prekalCIFEROLA se konvertuje u holekalciferol (Yang i sar., 2013). Pored holekalciferola postoji i ergokalCIFEROL (vitamin D₂), polazno jedinjenje druge familije, i nastaje od ergosterola koga proizvode kvasci. ErgokalCIFEROL ima samo jednu trećinu aktivnosti holekalciferola (Jovičić i sar., 2012). I vitamin D₃ stvoren u koži i vitamin D₂ absorbovan iz digestivnog trakta, putuju do jetre gde se hidroksilizuju na 25 poziciji ugljenika u kalcidiol (25-(OH) vitamin D) koji je glavni

cirkulatorni oblik vitamina D. Nakon hidroksilacije u jetri, kalcidiol se dalje hidroksiliše u bubrezima pri čemu se stvara kalcitriol (1, 25-(OH)₂D₃). Sinteza aktivne forme u bubrezima zavisi od parathormona (PTH) i koncentracije Ca²⁺. Međutim, hidroksilacija na prvom C atomu se može odigrati i na lokalnom nivou u drugim ćelijama i organima (Pilz i sar., 2011). Ova ekstrarenalna sinteza aktivnog oblika vitamin D zavisi od nivoa cirkulišućih nivoa 25-(OH) vitamina D.



Slika 2. Šematski prikaz sinteze i strukturnih analoga vitamina D. Preuzeto i modifikovano sa onlajn izvora http://www.globalrph.com/vitamin_d.htm

Postoje dokazi da se sinteza vitamina D i metabolisanje odigravaju i unutar CNS-a. Prisustvo 1 α -hidroksilaze u neuronima i glija ćelijama kako mozga u razvoju tako i kod odraslih sugerše sintezu aktivne forme vitamin D na lokalnom nivou (Fu i sar., 1997; Eyles i sar., 2005), dok je u kulturi ćelija pokazano da ćelije mikroglije mogu prevesi 25-(OH) vitamin D u 1, 25-(OH)₂D₃ (Boontanrart i sar., 2016).

Takođe, i 25-(OH) vitamin D i 1, 25-(OH)₂D₃ prolaze kroz krvno moždanu barijeru. Zanimljivo je da su nivoi 1, 25-(OH)₂D₃ u CNS-u u korelaciji sa nivoom 25-(OH) vitamina D u serumu, ali ne i sa serumskim nivoom 1, 25-(OH)₂D₃ kod miševa koji su na dijetskoj suplementaciji vitaminom D (Spach i Hayes, 2005). Osim toga, ključni enzim u katabolizmu vitamina D, CYP24A1, je pronađen u primarnoj kulturi astrocita pacova, kao i u humanim neuronima i astrocitima (Naveilhan i sar., 1993, Smolders i sar., 2013). Vitamin D utiče na ekspresiju CYP24A1, na dozno zavisani način, tako da aktivan oblik vitamin D može uticati na sopstvenu degradaciju, tj. podleže autoregulaciji.

Kako je vitamin D hormon lipofilne prirode u cirkulaciji se nalazi vezan za svoj vitamin D vezujući protein (engl, *vitamin D binding protein*, VDB). VDB je odgovoran za transport holekalciferola do jetre, kalcidiola (25-(OH) vitamina D) do bubrega i calcitriola (1, 25-(OH)₂D₃) do ciljnih organa. Pored uloge da transportuje vitamin D, VDB ima ulogu faktora hemotakse, privlači neutrofile i učestvuje u aktivaciji osteoklasta (Kew i Webster, 1998; Schneider i sar., 1988), dok se kroz kontakt sa B i T limfocitima konvertuje u aktivacioni faktor makrofaga (Yamamoto i sar., 1993). Koncentracije VDB ne zavise od nivoa 25-(OH) vitamina D i ne pokazuju sezonske varijacije. VDB je u stalnom višku u odnosu na sopstveni cirkulišući ligand 25-(OH) vitamin D, a poluživot u plazmi mu iznosi 2,5 dana. Uklanja se u nekoliko različitih tkiva kao što su bubrezi, jetra, skeletni mišići, creva, pluća i kosti (Hammack i sar., 2004).

Dolaskom do ciljnih tkiva, aktivni oblik vitamina D svoje efekte ostvaruje preko VDR-a, koji pripada familiji jedarnih receptora. Kada se aktivni oblik vitamina D veže za VDR, dolazi do interakcije sa nuklearnim retinoidnim receptorom (engl, *retinoid X receptor*, RXR) i stvoreni kompleks se vezuje za vitamin D vezujući element (engl, *vitamin D response element*, VDRE) koji se nalazi na promotornim regionima različitih gena. Efekti vitamina D mogu biti direktni ili indirektni uticaj na ćelijski ciklus, proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu (Dick i sar., 1995), dok na nivou CNS-a, vitamin D, utiče na morfologiju, fiziologiju i ponašanje (Eyles i sar., 2005).

Distribucija VDR-a u mozgu – Receptor za vitamin D je široko distribuiran u adultnom mozgu i u mozgu koji se razvija. VDR se javlja u mozgu glodara već 12. embrionskog dana, sa predominantnom distribucijom u neuroepitelu i zonama diferencijacije kao što je mezecefalon (Cui i sar., 2017). Ovakva distribucija receptora upućuje da je vitamin D uključen u proliferaciju i diferencijaciju neuronalnih stem ćelija (Cui i sar., 2017). U mozgu odraslih glodara, VDR se može naći u različitim ćelijama, uključujući neurone, astrocite, i oligodendrocite u različitim delovima mozga (Eyles i sar., 2005; Cui i sar., 2017). U humanom mozgu, obrazac distribucije ovog receptora je izuzetno sličan već opisanom obrazcu kod glodara (Eyles i sar., 2005). Prisustvo VDR-a u hipokampusu, korteksu, limbičkom sistemu kod ljudi i glodara podržava pretpostavku da vitamin D ima ulogu u učenju, memoriji i kogniciji (Brewer i sar., 2001). Takođe se navode lokalizacije VDR-a koje upućuju da vitamin D ima ulogu u somatosenzornom sistemu i dopaminergičkim neuronima gde povećava sintezu dopamina (Cui i sar., 2017). Uzimajući u obzir prisustvo biosinteze vitamina D i njegovog receptora u CNS-u može se pretpostaviti da vitamin D utiče na moždano funkcionisanje u fiziološkim i patološkim stanjima.

Pored brojnih dokaza o genomskim efektima posredovanim vitaminom D u CNS-u, manje poznata je činjenica da vitamin D može pobuditi i brz, ne-genomski odgovor u mozgu (Zanatta i sar., 2012).

1.2.3 Uloge vitamina D

Najbolje proučena uloga vitamina D je u održavanju homeostaze kalcijuma plazme, zajedno sa paratireoidnim hormonom (PTH) i kalcitoninom. Međutim pored ove uloge vitamin D je i potentni modulator imunskog sistema, inflamatornog procesa, neuromuskularne funkcije, ćelijskog ciklusa (vitamin D može imati direktne ili indirektne efekte na ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu). Vitamin D ima značajnu ulogu u razvoju i funkcionisanju mozga, i ima neuroprotektivnu ulogu koju ostvaruje regulacijom produkcije neurotrofina. Dokazano je da vitamin D deluje na proteine za koje se zna da direktno utiču na proces učenja i pamćenja, motornu kontrolu, maternalno i socijalno ponašanje (Zhang i Naughton, 2010). Vitamin D svoje efekte ostvaruje na genomski zavisani i nezavisani način.

Genomski zavisni efekti vitamina D – se ostvaruju nakon ulaska aktivnog oblika vitamina D u ćeliju, njegove interakcije sa VDR, stvaranja kompleksa sa RXR-om i vezivanja ovog kompleksa za VDRE. Vitamin D svoje genomske uticaje sprovodi kako u periodu razvića mozga, tako i u adultnom dobu, s tim da su krajnji efekti različiti.

U periodu razvoja mozga vitamin D ima antiproliferativno, prodiferentno i proapoptotsko dejstvo na različita tkiva, uključujući i nervno. Ovo upućuje da bi nedostatak vitamina D mogao da uzrokuje povećanu proliferaciju i smanjenje obima apoptoze u mozgu u toku razvoja. Tako su u studiji razvojne deficijencije vitamina D ustanovljeni povišeni nivoi proteina koji utiču na progresiju ćelijskog ciklusa (ciklin B, ciklin C, ciklin D1) i represija proteina p21 koji je inhibitor ciklin zavisne kinaze (Cui i sar., 2017). Smanjen nivo apoptoze kod ovih životinja je verovatno rezultat smanjena ekspresije proapoptotskih gena (Bax, Bcl-2) (Ko i sar., 2004). Smatra se da vitamin D utiče na povećanje ekspresije Bax i Bcl-2 u ćelijama raka, ali još uvek nisu otkriveni vitamin D vezujući elementi ova dva gena (Kizildag i sar., 2012). Zanimljivo je da razvojna deficijencija vitamina D utiče i na povećanu proliferaciju nervnih stem ćelija u subventrikularnoj zoni, ali i na smanjenu stopu neurogeneze u adultnom hipokampusu (Cui i sar., 2017). Ova diskrepanca može nastati zbog razlike u stadijumu razvića i/ili starosti, različitim ispitivanim regionima mozga kao i prisustva uticaja različitih spoljašnjih faktora. Pored toga, razvojna deficijencija vitamina D remeti moždanu morfologiju. U zavisnosti od ispitivane vrste mogu se primetiti povećane ili smanjenje lateralnih ventrikula, dok se kod ljudi deficijencija vitamina D manifestuje smanjenim moždanim volumenom i uvećanim lateralnim ventrikulama (Cui i sar., 2017). Adekvatni nivo vitamina D je neophodan i za razviće dopaminergičkog sistema. Naime, vitamin D reguliše metabolizam dopamina, regulišući gensku ekspresiju katehol-O-metil transferaze (engl, *catechol-O-methyltransferase*, COMT) koja je ključni enzim u obrtu dopamina. Dalje, vitamin D utiče na diferencijaciju oligodendrocita iz neuronalnih stem ćelija i podstiče sazrevanje progenitora oligodendrocita, što posledično utiče na proces mijelinizacije. Pored oligodendrocita promoviše i diferencijaciju nervnih ćelija (Cui i sar., 2017).

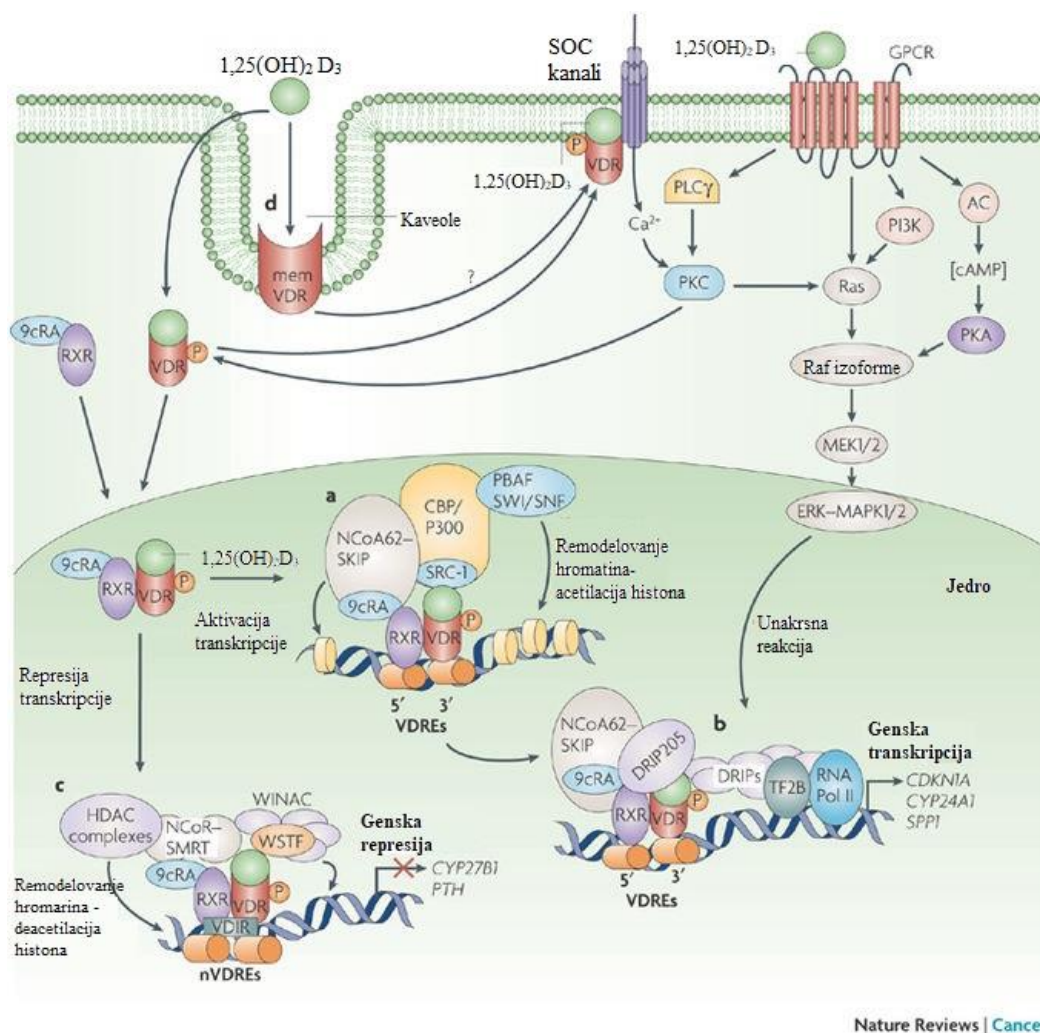
U adultnom (razvijenom) mozgu vitamin D utiče na oslobađanje neurotransmitera. Tako tretman vitaminom D dovodi do povećanja koncentracije dopamina i njegovih

metabolita – 3,4-dihidroksifenilsirćetne kiseline (engl, *3,4-Dihydroxyphenylacetic acid*, DOPAC) i homovanilinske kiseline (engl, *homovanillic acid*, HVA) i povećanja ekspresije COMT i MAO-A. Vitamin D je u vezi i sa enzimima glutamat dekarboksilaze GAD65 i GAD67 koji u astrocitima prevode glutamat u GABA-u, a na nivo serotonina utiče preko triptofan hidroksilaze 2 (TPH 2). Ovaj vitamin vrši i neuroprotekciju i poboljšava kogniciju tako što dovodi do povećane ekspresije čak 27 gena uključenih u vezikularni sinaptički transport i oslobađanje neurotransmitera (Latimer i sar., 2014). Zatim, vitamin D utiče na oslobađanje neurotrofnih faktora. Smatra se da ima direktan transkripcioni efekat na nervni faktor rasta (engl, *nerve growth factor*, NGF), a takođe i da utiče na povećanje ekspresije iRNK u astrocitima za neurotrofni faktor porekla glija ćelija (engl, *glial cell-derived neurotrophic factor*, GDNF), neurofine 3 i 4 (NT-3, NT-4) i neurotrofni moždani faktor (engl, *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) (Gezen-Ak i sar., 2011; Naveilhan i sar.,1996; Neveu i sar.,1994; Wang i sar.,2005). Vitamin D takođe utiče i na faktore inflamacije. Smanjeni nivoi vitamina D su povezani sa višim vrednostima C reaktivnog proteina (CRP) (Alfieri i sar., 2017), dok primena ovog vitamina dovodi do povećanja nivoa IL-10 koji smanjuje nivo supresora citokinskog signala 3 (engl, *Suppressor of cytokine signaling 3*, SOC-3) dovodeći do manje sinteze proinflatornih citokina (Boontanrart i sar., 2016). Efekti vitamina D se odražavaju i na očuvanje integriteta krvno moždane barije. Smatra se da je ovaj efekat posredovan povećanjem ekspresije i funkcije P-glikoproteina koji je zadužen za odstranjivanje štetnog i stranog materijala (Durk i sar., 2012). Novije studije upućuju da vitamin D deluje i putem NF- κ B na očuvanje krvno moždane barijere (Won i sar., 2015).

Direktni efekti vitamin D – genomski nezavisni – Ovaj način dejstva vitamina D obuhvata procese koji su uzrokovani vitaminom D, ali su nezavisni od genske transkripcije jer se odigravaju brzo u toku nekoliko sekundi ili minuta (Cui i sar., 2017). Mnogo godina unazad je poznato da vitamin D ostvaruje i ovu vrstu efekata. Proučavanja su vršena na *in vitro* modelima različitih ćelijskih linija. Na nivou mozga se zna da su ovi efekti uključeni u ćelijske i sinaptičke procese.

Do prvog velikog otkrića vezanog za ovakav način dejstvovanja vitamina D došao je Zannata i sar. (2012) utvrdivši da je aktivni oblik vitamina D zadužen za Ca^{2+} i kinazni

signalni put u toku razvića korteksa mozga. Pokazano je da aplikacija vitamina D uzrokuje povećano preuzimanje Ca^{2+} iz ekstracelularnog prostora i da je ovaj proces zavisian od protein kinaze A (engl, *protein kinase A*, PKA), Ca-kalmodulin zavisnih kinaza, MAP kinaza, fosfatidilinozitol 3 kinaze (engl, *phosphatidil inositol kinase 3*, PI3K), ali ne i od protein kinaze C (engl, *protein kinase C*, PKC) i ERK 1/2. Tako da vitamin D utiče i na jone Ca^{2+} , ali i na nabrojane kinaze. Važno je napomenuti sa Ca^{2+} predstavlja i sekundarni glasnik, tako da nije najjasnije koji proces inicira signalnu kaskadu, s obzirom na to da je influx Ca^{2+} i efekat i posledica vitamina D (Revelli i sar., 1998).



Nature Reviews | Cancer

Slika 3. Šematski prikaz signalnih puteva vitamina D. Preuzeto i modifikovano iz Deeb K. i sar., 2007, *Nature Reviews Cancer* vol 7: 684–700

Sledeće dejstvo vitamina D nezavisno od genske transkripcije je njegova sposobnost da balansira odnos ekscitacije i inhibicije na nivou lokalnih nervnih mreža. Ovo postiže tako što snižava frekvenciju spontane GABAergičke struje, kao i unutrašnju struju posredovanu ekscitacijom NMDA i kainatnih receptora i to na reverzibilan način i nezavisan od akcionog potencijala (Bhattarai i sar., 2016). Pored toga vitamin D brzo reguliše sinaptičku transmisiju gonadotropnog oslobađajućeg hormona (GnRH) u neuronima (Bhattarai i sar., 2016).

Još uvek nije ustanovljen receptor putem kojeg vitamin D ostvaruje ove efekte. Međutim, Zannata i sar. (2012) su utvrdili da je klasičan jedarni VDR lokalizovan zajedno sa kaveolinom na plazma membrani neurona, ali i drugih ćelija (Buitrago i Boland, 2010). Takođe, nađeno je da za ove direktne efekte vitamina D, pored membranskog VDR, neophodan i član 3 protein disulfid izomeraze familije A, (engl, *protein disulfide-isomerase A3*, PDIA3) (Boyan i sar., 2002; Chen i sar., 2010). Naime, utvrđeno je da antitela na PDIA3 i male interferirajuće RNK (engl, *small interfering RNA*, siRNK) usmerene ka PDIA3 transkripta, blokiraju ili smanjuju genomski nezavisan odgovor vitamina D (Boyan i sar., 2002; Chen i sar., 2010, 2013).

1.3 Animalni eksperimentalni model moždane ishemije

S obzirom na poražavajuću incidencu moždanog udara u opštoj populaciji, stopu mortaliteta i invaliditeta nakon moždanog udara, bilo je neophodno razviti odgovarajuće eksperimentalne animalne modele koji bi oponašali karakteristike moždanog udara kod ljudi. Animalni eksperimentalni modeli moždanog udara predstavljaju osnovni alat za razumevanje kompleksnih ćelijskih i molekularnih promena, kao i za testiranje tehnika rekanalizacije, neuroprotekcije, neuroregeneracije ili antiinflamatorne lekove u predkliničkoj fazi. Eksperimentalni modeli moždanog udara razvijani su od 1970-ih (Yan i sar., 2015), te danas postoji mnogo modela moždanog udara u različitim životinjskim vrstama, uključujući primat, svinje, ovce, pse, mačke, mongolske gerbile, zečeve, pacove i miševе (Bacigaluppi, 2010). Ovi modeli se koriste za procenu patofizioloških posledica, testiranje terapijskih strategija i procenu faktora rizika za moždani udar, kao za i istraživanje efekata komorbiditeta na ishod moždanog udara (Macrae, 2011).

Modele moždanog udara možemo podeliti u dve grupe. Prva grupa je orjentisana na ispitivanje faktora rizika (genetski i spoljašnji) koji doprinose nastanku moždanog udara i na otkrivanje terapijskih strategija koji bi sprečili ovaj ishod. Druga grupa modela proučava patofiziološke promene koje su uzrokovane moždanim udarom, kao i testiranje terapijskih strategija. Ova grupa se deli na modele fokalne i globalne moždane ishemije, dok se prema trajanju ishemije modeli dele na permanentne ili tranzitorne (Bacigaluppi, 2010).

Fokalna ishemija se karakteriše redukcijom protoka krvi u određenom regionu mozga, dok globalna ishemija pogađa ceo mozak ili prednji mozak. Za proučavanje fokalne ishemije potrebno je okludirati arteriju (proksimalna ili distalna okluzija arterije *cerebri mediae*) ili venu (okluzija cerebralne vene ili venskog sinusa), i to mehanički ili izazivanjem tromboembolije.

Globalna cerebralna ishemija sa kritičnom redukcijom cerebralnog protoka u celom mozgu izaziva selektivnu neuronsku povredu u CA1 regionu hipokampusa, Purkinjijevih ćelija, i u frontalnom neokorteksu ukoliko je trajanje ishemije ograničeno. Animalni modeli globalne moždane ishemije uvedeni su da imitiraju ishemijske

povrede posle smanjenja cerebralnog protoka i naknadne reperfuzije, najčešće uzrokovane srčanim zastojem. Uopšteno gledano, široko se koriste dva modela globalne cerebralne ishemije: model okluzije četiri krvna suda (engl, *four-vessel occlusion*, 4-VO) kod pacova i modela okluzije dva krvna suda – okluzija karotidnih arterija (engl, *two-vessel occlusion*, 2-VO). Postoji nekoliko drugih modela globalne cerebralne ishemije, kao što su ventrikularna fibrilacija i okluzija tri krvna suda (engl, *three-vessel occlusion*, 3-VO) (Bacigaluppi, 2010; Yan i sar., 2015).

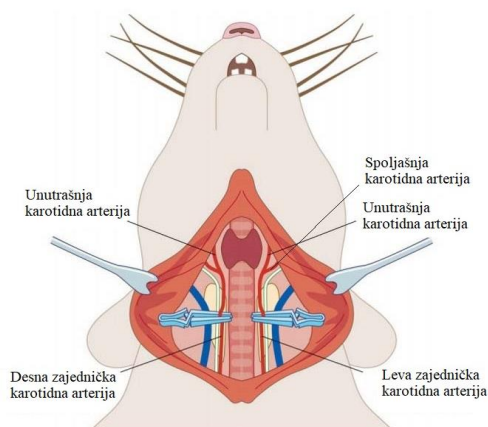
Model okluzije četiri krvna suda - Model 4-VO razvijen je za proučavanje reverzibilne bilateralne ishemije prednjeg mozga i ishemije moždanog stabla sa visoko predvidljivim oštećenjem mozga u svesnih, slobodno pokretnim pacovima. Originalni model uključuje dvostepenu operaciju sa trajnom okluzijom vertebralnih arterija prvog dana, nakon čega sledi prolazna okluzija zajedničkih karotidnih arterija (engl, *common carotid arteries*, CCA) sledećeg dana. U ovom modelu, promene u protoku krvi su u korelaciji sa distribucijom i progresijom neuronskog oštećenja. S obzirom na neželjene efekte u smislu krvarenja i traume koja dovode do visoke smrtnosti, klasičan 4-VO model je razvijen kod miševa. Ovaj model je indukovao zahvaljujući obostranoj okluziji CCA i leve arterije subklavije, plus stenozom desne arterije subklavije. Ovim putem protok krvi kroz mozak se smanjuje na manje od 10% pre-ishemijske vrednosti. Ovaj model ima nekoliko prednosti: reproducibilan ishemijski insult, adekvatan nivo reperfuzije i nisku stopu mortaliteta (10%) (Bacigaluppi, 2010; Yan i sar., 2015).

Model okluzije dva krvna suda - model 2-VO je alternativa 4-VO modelu sa kombinacijom obostrane CCA okluzije i sistemske hipotenzije radi stvaranja reverzibilne ishemije prednjeg mozga. Ovaj metod proizvodi ishemiju u svim ranjivim područjima prednjeg mozga, kao što su CA1 piramidalni neuroni hipokampusu, neokorteksa, putamena i kaudatsa što rezultira oštećenjem mozga koji blisko oponaša oštećenje na mozga nakon srčanog udara. U poređenju sa 4-VO, model 2-VO je jednostavniji za izvođenje i potpuno je reverzibilan.

Model okluzije tri krvna suda - model 3-VO kombinuje okluziju bazilarne arterije sa privremenom obostranom okluzijom CCA kod pacova i miševa (Bacigaluppi, 2010; Yan i sar., 2015).

Ventrikularni modeli fibrilacije - Kod odraslih pacijenata, globalna ishemija je obično uzrokovana srčanim zastojem sa ventrikularnom fibrilacijom. Model ventrikularnog fibrilacije se koristi za proučavanje mehanizama odložene neuronske smrti izazvane srčanim zastojem. Ovaj model je odličan za proučavanje efikasnosti neuroprotektivnih lekova (Bacigaluppi, 2010; Yan i sar., 2015).

U našem istraživanju koristili smo model okluzije dva krvna suda u mongolskih džerbila. Obostrana okluzija zajedničke karotidne arterije kod džerbila je dovoljna da proizvede ozbiljnu prednje moždanu ishemiju. Ovo se dešava iz razloga što džerbilima nedostaje posteriorna komunikantna arterija koja je neophodna kako bi Willisov krug bio potpun (Small, 2000).



Slika 4. Šematski prikaz izazivanja globalne moždane ishemije postavljanjem mikroaneurizmatičkih klipsi na zajedničke karotidne arterije. Preuzeto i modificirano iz Wayman i sar., 2016, *Journal of Visualized Experiments*

Problem sa kojim se susrećemo koristeći animalne modele jeste da se moždani udar u opštoj populaciji najčešće odigrava u starijem životnom dobu sa prisutnim komorbiditetima i različitim faktorima rizika, dok u laboratorijskim uslovima, moždani udar se izaziva mladim, zdravim životinjama. Prepoznaje se potreba za uključivanjem više eksperimentalnih varijabli, te da se uvedu životinjske linije sa rizikom za vaskulane povrede, kao što su prisustvo dijabetesa, ateroskleroze kod glodara ili upotreba starih životinja u istraživanju.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ispitati efekte pretretmana vitaminom D na pokazatelje oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u prefrontalnom korteksu i hipokampusu mongolskih džerbila izloženih desetominutnoj prolaznoj globalnoj ishemiji mozga i reperfuziji u trajanju od jednog, tri ili sedam dana.

Ispitati efekte pretretmana vitaminom D na ekspresiju markera apoptoze i markera autofagije u korteksu i hipokampusu mongolskih džerbila izloženih desetominutnoj prolaznoj globalnoj ishemiji mozga i reperfuziji u trajanju od jednog, tri ili sedam dana primenom tehnike Western blota.

Ispitati efekte pretretmana vitaminom D na zastupljenost pojedinih ćelija centralnog nervnog sistema upotrebom odgovarajućih markera neurona i glije u korteksu i hipokampusu mongolskih džerbila izloženih desetominutnoj prolaznoj globalnoj ishemiji mozga i reperfuziji u trajanju od jednog, tri ili sedam dana tehnikama Western blota i imunohistohemije.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Eksperimentalne životinje

Eksperimentalni rad je obavljen na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu i na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademiji. U eksperimentima su korišćeni pustinjiski miševi (*Meriones Unguiculatus*, eng. *Mongolian gerbils*, džerbili), muškog pola, prosečne, težine oko 65 grama, starosti 12 nedelja. Životinje su dobijene iz uzgajališta vivarijuma Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Životinje su čuvane u transparentim kavezima od pleksiglasa, obloženim šuškom, sa žičanom rešetkom postavljenom odozgo, pod standardnim uslovima sredine (temperatura $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, relativna vlažnost vazduha 50–60% i 12-časovni režim svetlo-tama). Hrana (specijalni briketi za ishranu eksperimentalnih životinja) i voda su im bili dostupni *ad libitum*. Sve eksperimentalne procedure su bile odobrene od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (dozvola broj 1686/2). Svi eksperimenti vršeni su u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja u Republici Srbiji.

3.2 Eksperimentalne grupe

U kontrolnoj grupi (n=16) životinje su podvrgnute hirurškoj intervenciji bez izazivanja ishemije. Četrdeset osam životinja je podvrgnuto procesu ishemije tokom 10 minuta, nakon čega su podeljene u tri eksperimentalne grupe. Prva grupa (n=16) bila je izložena reperfuziji u trajanju od jednog dana (I/R 1d), druga (n=16) u trajanju od 3 dana (I/R 3d) i treća (n=16) sedam dana (I/R 7d). Drugih 48 životinja je tretirano vitaminom D sedam dana pre izazivanja ishemije. I ove životinje su zatim podeljene u tri grupe u odnosu na trajanje reperfuzije. U prvoj grupi (n=16) reperfuzija je trajala jedan dan (vitD+I/R 1d), u drugoj (n=16) tri dana (vitD+I/R 3d) i u trećoj (n=16) sedam dana (vitD+I/R 7d).

3.3 Tretiranje životinja

Aktivna forma vitamina D ($1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$) (*Calcitriol*, *Abbott lab*) bila je aplikovana u dozi od $1\mu\text{g/kg}$ na dan tokom sedam dana, intraperitonealno (i.p.) (Ekici i sar., 2009). Ishemija je izazvana tako što su džerbili postavljeni u dorzalnu poziciju. Prvo im je

obrijano područje vrata, a zatim je pažljivo tupom disekcijom pristupljeno zajedničkim karotidnim arterijama. Prolazna globalna ishemija je izvedena postavljanjem mikroaneurizmatičkih klipova na obe zajedničke karotidne arterije tokom 10 minuta, nakon čega su klipove uklonjene, a reperfuzija je bila vizuelno potvrđena. Koža vrata je bila ušivena sa tri do četiri labava šava. Reperfuzija je trajala jedan, tri odnosno sedam dana. Džerbili kontrolne grupe su takođe bili izloženi hiruškoj proceduri, ali mikroaneurizmatičke klipove nisu bile postavljene na zajedničke karotidne arterije.

3.4 Izolacija struktura za biohemijske analize

Za biohemijska ispitivanja je žrtvovano po 6 nasumično izabranih životinja iz svih eksperimentalnih grupa. Glave životinja su nakon dekapitacije bile trenutno zamrzavane u tečnom azotu. Dorzolateralni prefrontalni korteks i hipokampus su bili preparisani na hladno i homogenizovani u hladnom puferisanom saharoznom medijumu (0,25M/L saharoze, 10 mmol/ K/NaPO₄ pufer pH=7.0 i 1mmol/L EDTA). Homogenizacijom usitnjeno tkivo je potom bilo centrifugirano (1000G, 15 minuta). Supernatanti su bili centrifugirani 30 minuta na 20000G. Ovako dobijeni supernatant predstavlja neprečišćenu sinaptozomalnu frakciju koja sadrži membranske vezikule (mikrozome) nastale od glatkog i granulisanog endoplazmatskog retikuluma, Goldžijevog aparata i plazma membrane kao i sve solubilne komponente citoplazme. Talog je bio resuspendovan u dejonizovanoj vodi i ostavljen 60 minuta na +4°C uz povremeno mešanje, a zatim centrifugiran na 1700G 15 minuta. Dobijeni supernatant predstavlja neprečišćenu mitohondrijalnu frakciju i sadrži mitohondrije, lizosome i peroksizome. Neprečišćene, sinaptozomalna i mitohondrijalna, frakcije su čuvane na -80 °C.

3.5 Biohemijske analize

U uzorcima neprečišćene sinaptozomalne frakcije korteksa i hipokampusa spektrofotometrijski je određivan je sadržaj superoksidnog anjona, malondialdehida, sulfhidrilnih grupa i redukovano glutaciona, kao i aktivnost pojedinih enzimskih sistema (SOD, GPx, GR, γGCL).

3.5.1 Merenje sadržaja proteina

Koncentracija proteina u uzorcima je određivana spektrofotometrijski po metodi Lowry i sar. (1951). Kao standard je korišćen katalizovan serumski albumin govečeta BSA (*Sigma*). Količina proteina je određivana u supernatantu za određivanje enzimske aktivnosti neposredno po ekstrakciji. Razblaživanjem sa saharoznim medijumom koncentracija proteina je u svim uzorcima svedena na približno 1mg/ml.

3.5.2 Koncentracija malonildialdehid - MDA

Stepen lipidne peroksidacije određivan je na osnovu sadržaja MDA u sinaptosomalnoj frakciji korteksa i hipokampusa po metodi Rehnrona i sar. (1980). Malonildialdehid (MDA) nastao iz polinezasićenih masnih kiselina u procesu lipidne peroksidacije reaguje sa tiobarbituratnom kiselinom (TBA) stvarajući obojeni kompleks. Količina stvorenog MDA-TBA kompleksa merena je spektrofotometrijski na 533nm i predstavlja indeks lipidne peroksidacije. Rezultati su izraženi u mmol po miligramu proteina uzorka (mmol/mg proteina).

3.5.3 Koncentracija superoksidnog anjona - O₂⁻

Koncentracija superoksidnog anjona je određivana redukcijom nitro plavog tetrazoliuma (NBT) po metodi Spitz i Oberley (1989). Redukcija NBT je određivana spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 560 nm. Rezultati su izraženi u nmol po milligramu proteina uzorka (nmol/mg proteina).

3.5.4 Koncentracija sulfhidrilnih grupa - SH grupa

Određivanje koncentracije sulfhidrilnih grupa vršeno je spektrofotometrijskom metodom korišćenjem Ellman ovog reagensa (5,5' ditiobis-2-nitrobenzoična kiselina - DTNB) po metodi Sedlak i Lindsay (1968). DTNB se redukuje u prisustvu SH grupa u nitromerkaptobenzoični kiseli anjon žute boje. Sulfhidrilne grupe su određivane merenjem absorbance na 412nm. Rezultati su izraženi u nmol po milligramu proteina uzorka (nmol/mg proteina).

3.5.5 Određivanje količine redukovanoG glutationa - GSH

Sadržaj GSH je određen metodom po Ellman-u (35) upotrebom DTNB-a, tzv. Ellman-ovog reagensa, koji reagujući sa alifatičnim tiolnim jedinjenjima u alkalnoj sredini gradi p-nitrofenolni anjon žute. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini od 412nm. Rezultati su izraženi u nmol po miligramu proteina uzorka (nmol/mg proteina).

3.5.6 Aktivnost enzima superoksid dizmutaze - SOD

Aktivnost SOD određivana je kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u baznoj sredini po metodi Sun i Zigman (1978). Step en inhibicije srazmeran je aktivnosti enzima. Aktivnost ukupne SOD određivana je kinetički, kao promena ekstinkcije u vremenu (10 minuta) na talasnoj dužini od 480nm. Rezultati su izraženi u internacionalnim jedinicama po miligramu proteina (IU/mg proteina).

3.5.7 Aktivnost enzima glutation peroksidaze, glutation reduktaze i gama glutamil cistein sintetaze

Aktivnost GPx, GR i γ GCL su određivane metodama koje se zasnivaju na merenju utroška redukovanoG nikotinamid-adenin-dinukleotida (NADH) ili nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata (NADPH) tj. kao smanjenje apsorbance na 340 nm (Günzle i sar., 1974; Carlberg i Mannervik, 1985; Seeling i Meister, 1985). Rezultati su izraženi u internacionalnim jedinicama po miligramu proteina uzorka (IU/mg proteina).

3.6 Određivanje ekspresije proteina tehnikom Western blot

Ekspresija proteina je određena tehnikom Western blot-a. Za ove eksperimente je korišćeno po pet životinja iz svake grupe. Dorzolateralni prefrontalni korteks i hipokampus su preparisani na hladno, a potom su izolovani ukupni proteini u lizirajućem RIPA puferu (300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH=7.5, 0.2% SDS, 2% Na-deoksiholat, 2% Triton X-100) koji sadrži proteazne inhibitore (proteaza inhibitor koktel, 100mM PMSF, 200mM Na-ortovanadat i 1M NaF). Koncentracija proteina je određena metodom po Bradford-u. Elektroforeza proteina je izvršena na denaturišućem SDS poliakrilamidnom gelu, nakon čega je usledio transfer proteina sa gela na

nitroceluloznu membranu. Membrane su potom bile inkubirane u 5% nemasnom mleku radi blokiranja nespecifičnih mesta vezivanja. Posle blokiranja membrane su inkubirane sa sledećim primarnim antitelima: gp91^{phox} (1:500, zečje poliklonsko, Santa Cruz, SAD), p22^{phox} (1:500, zečje poliklonsko, Santa Cruz, SAD), p47^{phox} (1:500, zečje poliklonsko, Santa Cruz, SAD), p67^{phox} (1:500, zečje poliklonsko, Santa Cruz, SAD), NOX4 (1:1000, zečje poliklonsko, Abcam, UK), SOD1 (1:500, kozje poliklonsko, Santa Cruz, SAD), SOD2 (1:500, kozje poliklonsko, Santa Cruz, SAD), VDR (1:100, zečje poliklonsko, Abcam, UK), AIF (1:1000, zečje poliklonsko, AnaSpec Inc, SAD), kaspaza 3 (1:1000, zečje poliklonsko, AnaSpec Inc, USA), beclin 1 (1:1000, zečje monoklonsko, Abcam, UK), LC3 (1:1000, zečje poliklonsko, Cell Signaling Technology, USA), p62 (1:5000, zečje poliklonsko, Cell Signaling Technology, USA), NeuN (1:1000, mišje monoklonsko, Millipore, USA), GFAP (1:1000, zečje poliklonsko, DAKO, Denmark), Iba1 (1:500, kozje poliklonsko, Abcam, UK), PV (1:3000, mišje poliklonsko, Abcam, UK) i β -aktin (1:10000, mišje monoklonsko, Sigma-Aldrich, Nemačka). Potom su membrane inkubirane sa odgovarajućim HRP-obeležanim sekundarnim antitelima i specifične proteinske trake su vizuelizovane pomoću ChemiDoc sistema (BioRad, SAD). Ekspresija proteina je analizirana denzitometrijski korišćenjem softvera ImageQuant5.2 i izražena u odnosu na β -aktin.

3.7 Ispitivanje morfoloških promena metodom transmisione elektronske mikroskopije

Za ispitivanje morfoloških promena u mozgu džerbila su žtvovane po 3 životinje iz svake eksperimentalne grupe. Uzorci korteksa i hipokampusu su isečeni i fiksirani u 3% rastvoru glutaraldehida (Merck, Nemačka) u 0.1 M kakodilatnom puferu pH=7,4 (Merck, Nemačka) preko noći na +4°C. Nakon osmifikacije i dehidratacije u etanolu, isecci mozga su kalupljeni u Epon (Merck, Nemačka). Ultratanki presecci dobijeni na ultramikrotomu Leica Ultracut UCT EM FCS su montirani na bakarne mrežice i bojani uranil acetatom i olovo citratom (SERVA Electrophoresis, Nemačka). Isecci su analizirani na FEI Morgagni 268(D) transmisionom elektronskom mikroskopu (FEI Europe, Holandija) i slikani pomoću Mega View III Soft Imaging System digitalne kamere (Olympus Soft Imaging Solutions, Nemačka).

3.8 Priprema uzoraka za imunohistohemijsku analizu

Za imunohistohemijska ispitivanja su korišćene po 4 nasumično izabrane životinje iz svake grupe. Životinje su anestetizirane sa 3,6% hloral hidratom (10 mL/kg t.m.) i zatim perfundovane sa 4% paraformaldehidom. Nakon perfuzije, mozgovi su prebačeni u 4% rastvor paraformaldehida (PFA) na 24 časa, nakon čeka su uronjeni rastvor saharoze (rastući gradijent koncentracije 10%, 20%, 30%), a potom trenutno zamrzavani uranjanjem u 2-metilbutan (Fluka Biochemika, Nemačka) prethodno ohlađenim na -85°C . Zamrznuti mozgovi sečeni su kriokatom (Leica Instruments, Nemačka), a debljina isečaka je iznosila 30 μm . Za potrebe imunohistohemijskog bojenja, najpre je izvršeno nespecifično blokiranje u odgovarajućem normalnom serumu (1h na sobnoj temperaturi). Nakon blokiranja, preseći su inkubirani 24–48h ($+4^{\circ}\text{C}$) u odgovarajućim primarnim antitelima: NeuN (1:1000, mišje monoklonsko, Millipore, USA), GFAP (1:500, zečje poliklonsko, DAKO, Denmark), Iba1 (1:500, kozje poliklonsko, Abcam, UK) i PV (1:1000, mišje poliklonsko, Abcam, UK), a zatim sa odgovarajućim sekundarnim antitelom (1h na sobnoj temperaturi). Za vizualizaciju je korišćen Vectastain ABC HRP Kit (PK-4002, Vector, UK) koji sadrži sekundarna antitela konjugovana sa kompleksom biotin-avidin-biotin za koje je vezan enzim peroksidaza rena. Nakon toga je usledila inkubacija sa 3,3'-diaminobenzidinom (DAB) koji je hromogeni supstrat za peroksidazu i dovodi do pojave braon reakcionog proizvoda na mestu prisustva antigena. Obojeni iseći su analizirani svetlosnim mikroskopom Olympus BX41 sa Olympus C5060-ADU digitalnom kamerom.

3.9 Statistička analiza

Rezultati su grafički prikazani kao srednja vrednost uzorka \pm standardna greška (SEM). Statistička obrada podataka vršena je u programu *OriginPro 8.1*. Za procenu statističke značajnosti između grupa je korišćena jednofaktorska analiza varijanse – univarijantna analiza ispitivanja uticaja odabranog prediktora za zavisnu varijablu – ANOVA, uz korišćenje Fisher-ovog post hoc testa. Ukoliko je verovatnoća da je nulta hipoteza (H_0 : postoji razlika između posmatranih veličina) tačna, bila jednaka ili manja od 5% ($p \leq 0,05$), razlika je smatrana statistički značajnom. Rezultati su prikazivani grafičkim stubičastim i linijskim dijagramima. Grafički prikaz rezultata urađen je u programu *OriginPro 8.1*.

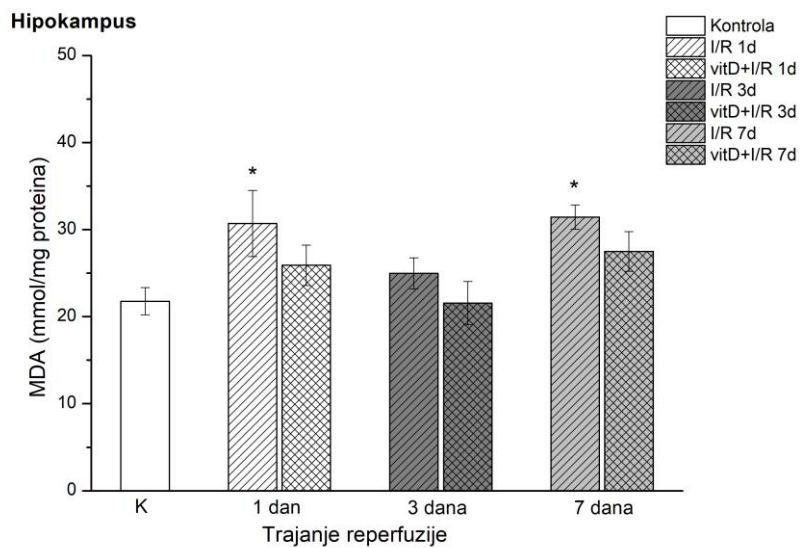
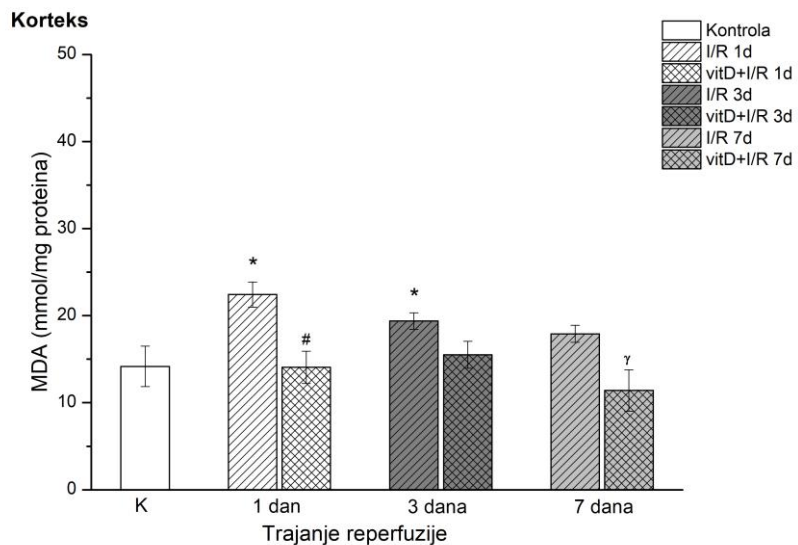
4. REZULTATI

4.1 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na pokazatelje oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta u korteksu i hipokampusu džerbila

4.1.1 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na nivo MDA i O_2^-

Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u nivou MDA u korteksu ($F_{6,36}=4,72$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,36}=2,36$; $p<0.05$) (Grafik 1). U korteksu nakon ishemije i reperfuzije u trajanju od jednog ili tri dana nivo MDA je statistički značajno povišen u odnosu na kontrolnu grupu, dok reperfuzija od sedam dana vraća nivo MDA na kontrolne vrednosti. U grupama I/R 1d i I/R 7d nivoi MDA su bili značajno viši u odnosu na grupe tretirane vitaminom D. Vitamin D je doprineo održavanju MDA vrednosti na kontrolnom nivou. U hipokampusu nivo MDA je statistički značajno povišen u I/R 1d i I/R 7d u odnosu na kontrolnu grupu, dok u svim ostalim eksperimentalnim grupama nije bilo statistički značajne promene nivoa MDA.

Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u nivou O_2^- u korteksu ($F_{6,36}=14,48$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,36}=5,84$; $p<0.05$) (Grafik 2). U korteksu i hipokampusu nakon ishemije i reperfuzije u trajanju od jednog ili tri dana nivo O_2^- je statistički značajno povišen u odnosu na kontrolnu grupu i odgovarajuće vitaminom D tretirane grupe, dok reperfuzije od sedam dana vraća nivo O_2^- na kontrolne vrednosti. U hipokampusu eksperimentalnih životinja tretiranih vitaminom D je nivo O_2^- bio održavan sve vreme na kontrolnim vrednostima, dok je u korteksu zabeleženo statistički značajno povećanje O_2^- u odnosu na kontrolnu grupu koje je bilo statistički značajno niže nego u I/R 1d grupi.

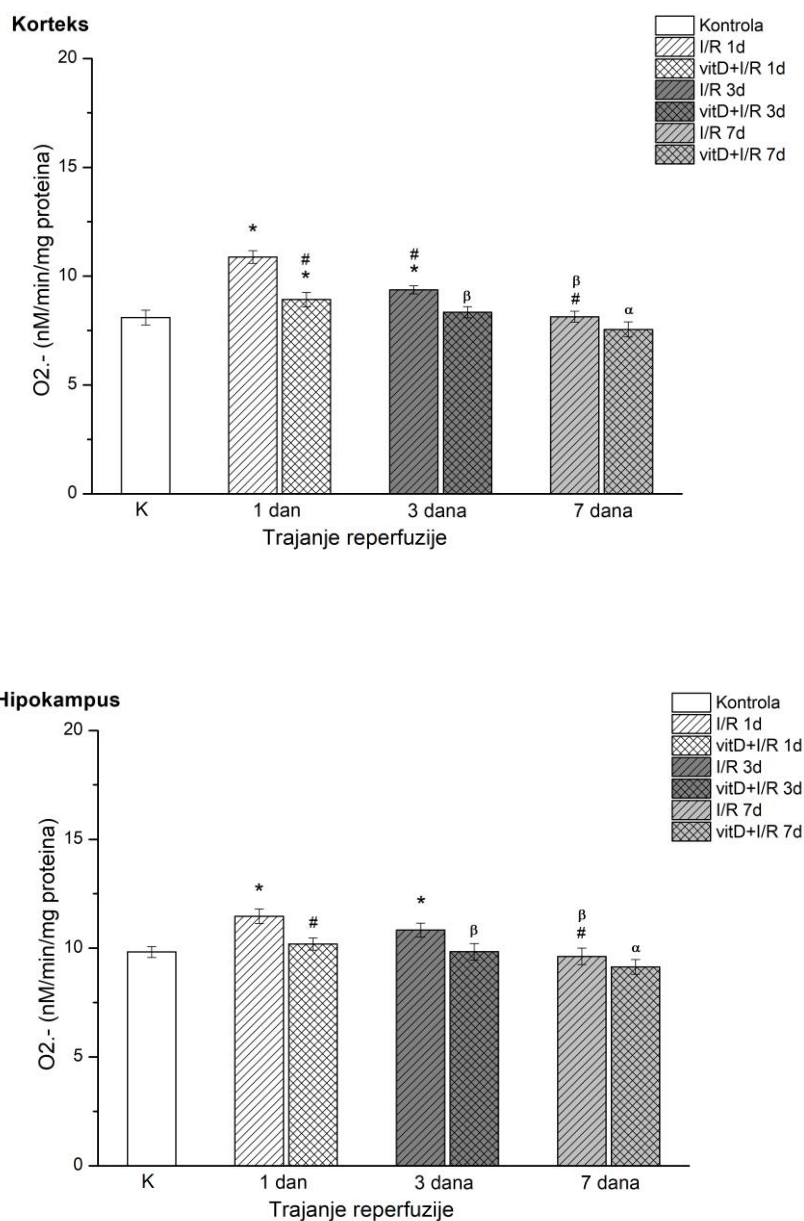


Grafik 1. Nivo malodialdehida (MDA) u neprečišćenju sinaptosomalnoj frakciji korteksa i hipokampusa u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.

$p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.

γ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 7d grupe.

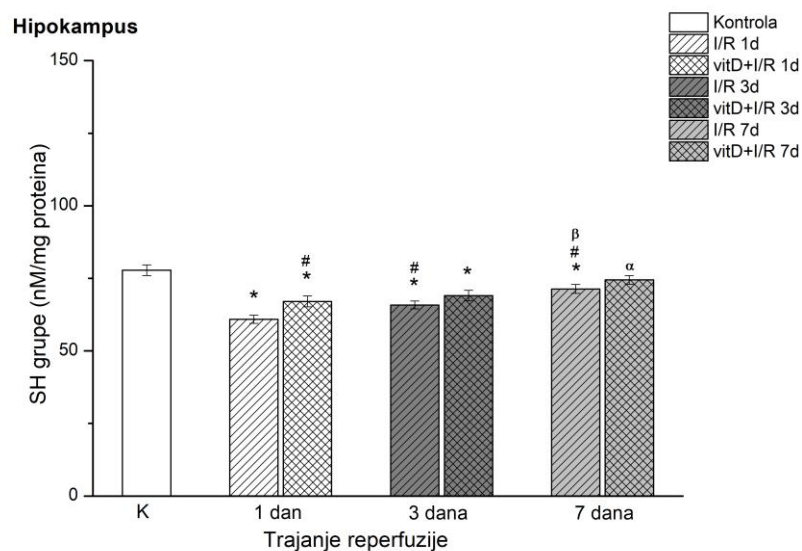
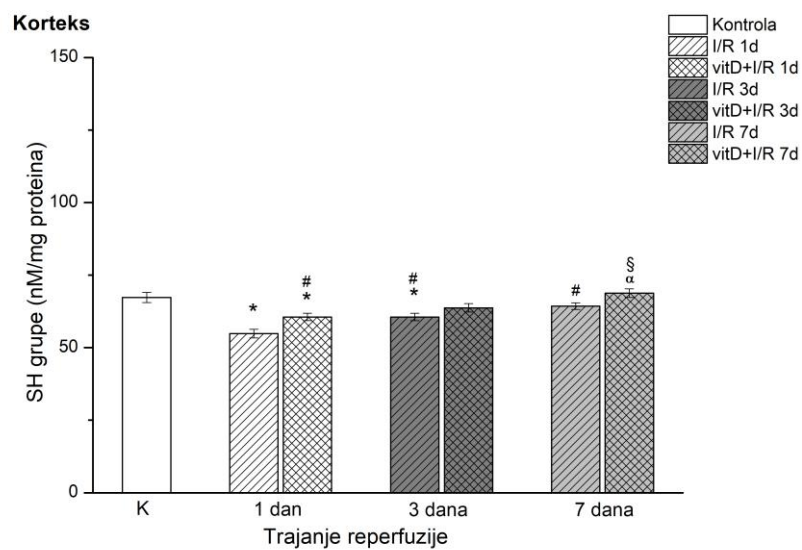


Grafik 2. Nivo superoksidnog anjona (O_2^-) u neprečišćenju sinaptosomalnoj frakciji korteksa i hipokampusa u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

- * $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.
- # $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.
- β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.
- α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.

4.1.2 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na koncentraciju sulfhidrilnih grupa (SH)

Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u koncentraciji SH grupa u korteksu ($F_{6,36}=10,74$; $p<0.05$) i u hipokampusu ($F_{6,36}=12,54$; $p<0.05$) (Grafik 3). U korteksu, nakon ishemije i reperfuzije u trajanju od jednog ili tri dana, koncentracija SH je statistički značajno snižena u odnosu na kontrolnu grupu, dok je reperfuzija od sedam dana praćena vraćanjem nivoa SH grupa na kontrolne vrednosti. U grupama I/R 1d nivoi SH su značajno niži u odnosu na grupu tretiranu vitaminom D. U grupama pretretiranim vitaminom D nakon jednog dana reperfuzije nivo SH grupa je značajno niži u odnosu na kontrolnu grupu, međutim već u trećem danu reperfuzije vidimo oporavak SH grupa do kontrolnih vrednosti, dok je nakon sedam dana reperfuzije nivo SH grupa značajno viši u odnosu na prvi i treći dan reperfuzije. U hipokampusu koncentracije SH grupa su statistički značajno snižene u I/R 1d, I/R 3d i I/R 7d u odnosu na kontrolu, a u grupi I/R 1d prisutno je statistički značajno sniženje i u odnosu na vitD+I/R 1d grupu. Pretretman vitaminom D nakon prvog i trećeg dana reperfuzije nije sprečio opadanje koncentracije SH grupa, ali je nakon sedam dana koncentracija bila jednaka koncentraciji na kontrolnom nivou.



Grafik 3. Koncentracije sulfhidrilnih grupa (SH) u neprečišćenju sinaptosomalnoj frakciji korteksa i hipokampusa u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.

$p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.

β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.

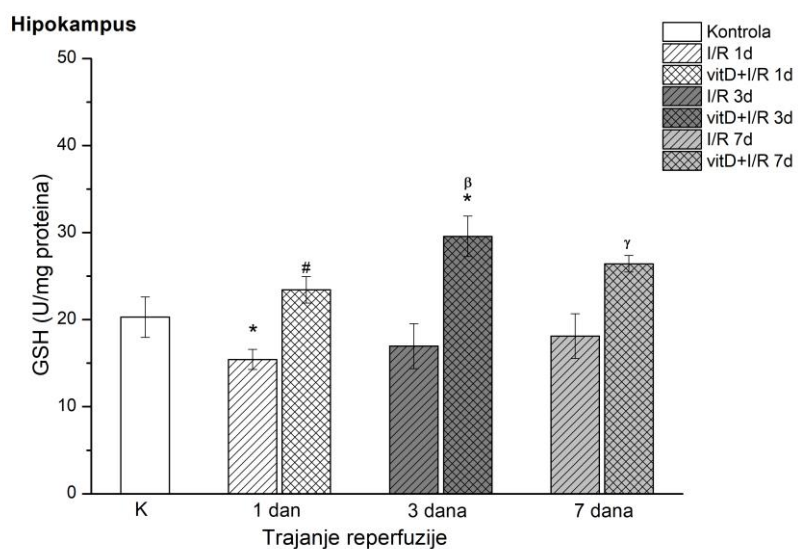
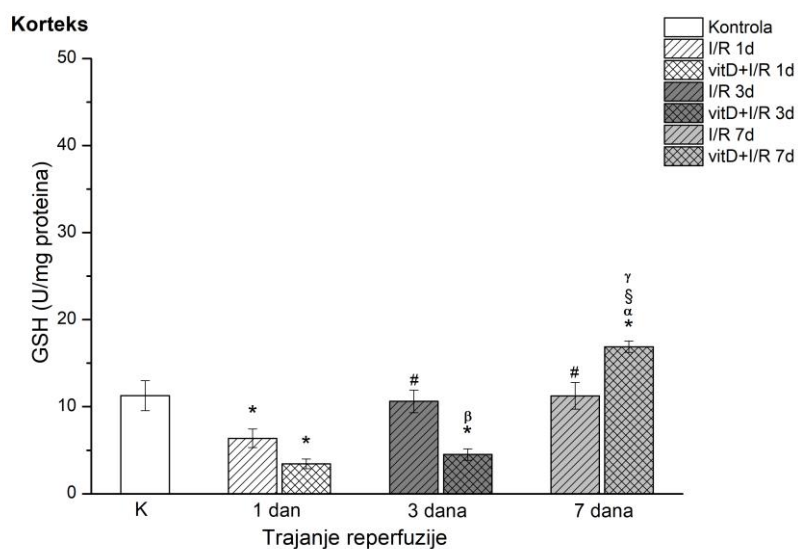
α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.

§ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 3d grupe.

4.1.3 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na nivo redukovanog glutaciona i aktivnost enzima glutation reduktaze, glutation peroksidaze i gama glutamin-cistein ligaze

Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u koncentraciji GSH u korteksu ($F_{6,36}=13,04$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,36}=5,69$; $p<0.05$) (Grafik 4). U korteksu vrednosti GSH su značajno snižene u grupama reperfundovanim jedan dan kao i u vitD+I/R 3d grupi u odnosu na kontrolnu. U sedmom danu reperfuzije u grupi koja je bila pretretirana vitaminom D javlja se statistički značajno povećanje količine GSH u odnosu na kontrolnu, obe vitamin D grupe i I/R 7d grupu. U hipokampusu vrednosti GSH su statistički značajno snižene u I/R 1d grupi, dok su u vitD+I/R 1d, vitD+I/R 3d i vitD+I/R 7d povišene u odnosu na odgovarajuće I/R grupe, a u vitD+I/R 3d grupi ova razlika je prisutna i u odnosu na kontrolnu grupu.

Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u aktivnosti GR u korteksu ($F_{6,36}=20,72$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,36}=32,44$; $p<0.05$) (Grafik 5.). U korteksu aktivnost GR je statistički značajno uvećana u svim grupama tretiranim vitaminom D u odnosu na kontrolu, kao i u odnosu na odgovarajuće I/R grupe. U hipokampusu je aktivnost GR povišena u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolu, dok su grupe tretirane vitaminom D imale statistički značajno veću aktivnost u odnosu na odgovarajuće I/R grupe. Takođe, u grupi vitD+I/R 7d ova aktivnost je povišena i u odnosu na vitD+I/R 3d.



Grafik 4. Količina redukovanog glutationa (GSH) u neprečišćenju sinaptosomalnoj frakciji korteksa i hipokampusa u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.

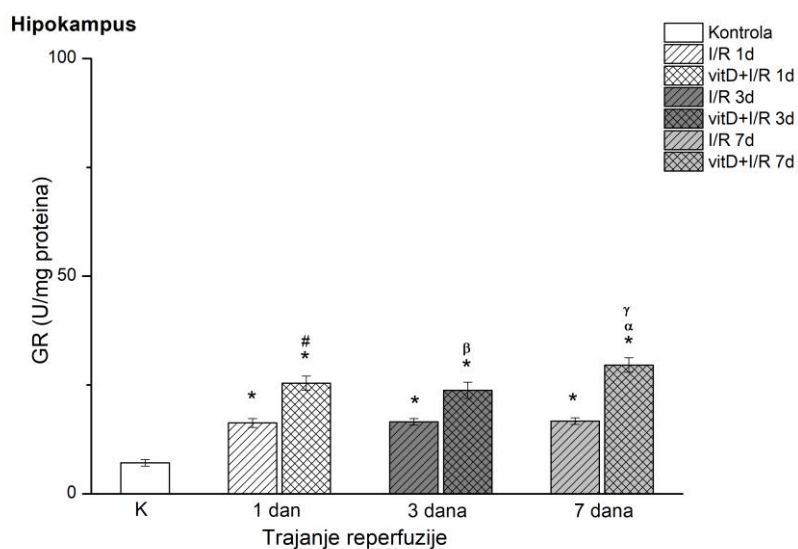
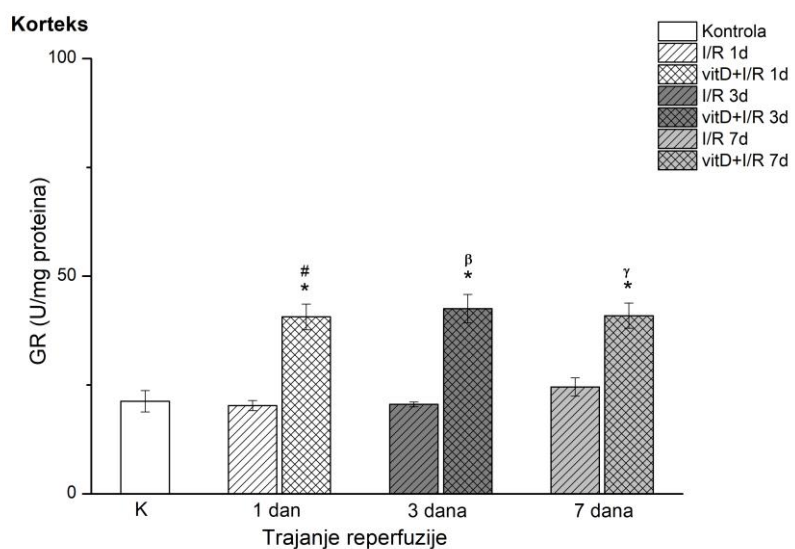
$p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.

β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.

γ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 7d grupe.

α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.

§ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 3d grupe.



Grafik 5. Aktivnost glutacion reduktaze (GR) u neprečišćenoj sinaptosomalnoj frakciji korteksa u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.

$p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.

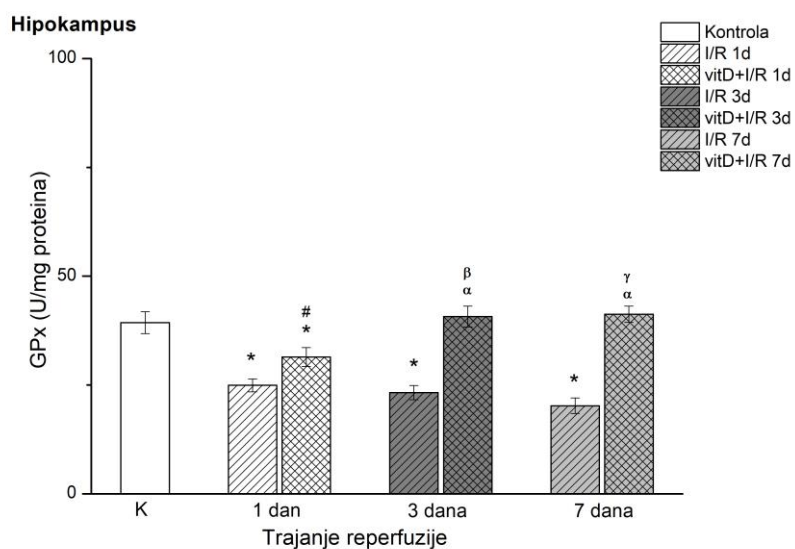
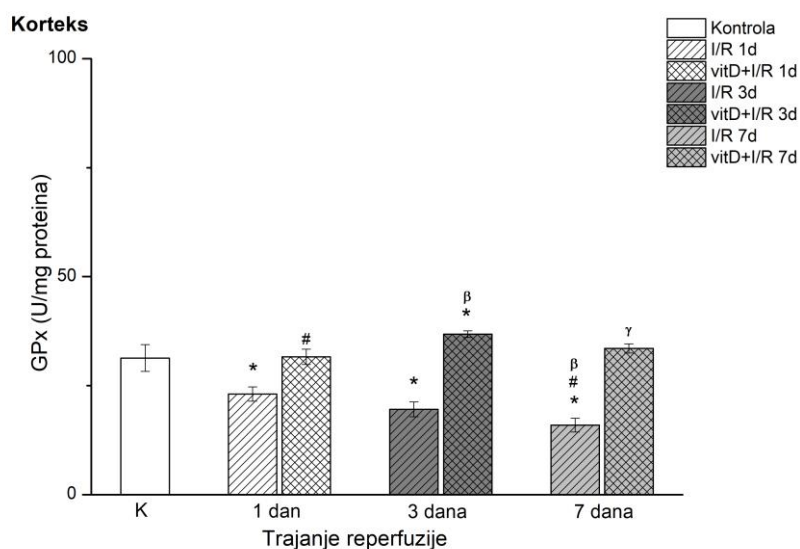
β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.

γ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 7d grupe.

α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u vitD+I/R 1d grupe.

Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u aktivnosti GPx u korteksu ($F_{6,36}=16,8$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,36}=18,31$; $p<0.05$) (Grafik 6.). U svim I/R grupama u ispitivanim strukturama aktivnost GPx je bila značajno niža u odnosu na kontrolu, ali i u odnosu na aktivnost GPx u odgovarajućim vitaminom D pretretiranim grupama. U korteksu, vitamin D je uticao na očuvanje aktivnosti GPx, dok je u vitD+I/R 3d ova aktivnost bila statistički veća u odnosu na kontrolnu. U hipokampusu vitamin D nije sprečio pad aktivnosti GPx, mada su ove vrednosti vraćene na kontrolni nivo već nakon tri dana reperfuzije i na tom nivou ostaju i nakon sedam dana reperfuzije.

Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u aktivnosti γ GCL u korteksu ($F_{6,36}=8,08$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,36}=16,93$; $p<0.05$) (Grafik 7). U korteksu svih životinja pretretiranih vitaminom D postoji značajno povećanje aktivnosti ovog enzima u odnosu na odgovarajuće I/R grupe, dok je u grupama vitD+I/R 3d i vitD+I/R 7d aktivnost statistički značajno veća i u odnosu na kontrolnu grupu. U hipokampusu u svim I/R grupama vrednost ovog parametra je statistički značajno niža u odnosu na kontrolnu i odgovarajuće vitD+I/R grupe.



Grafik 6. Aktivnost glutation peroksidaze (GPx) u neprečišćenoj sinaptosomalnoj frakciji korteksa i hipokampusa u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

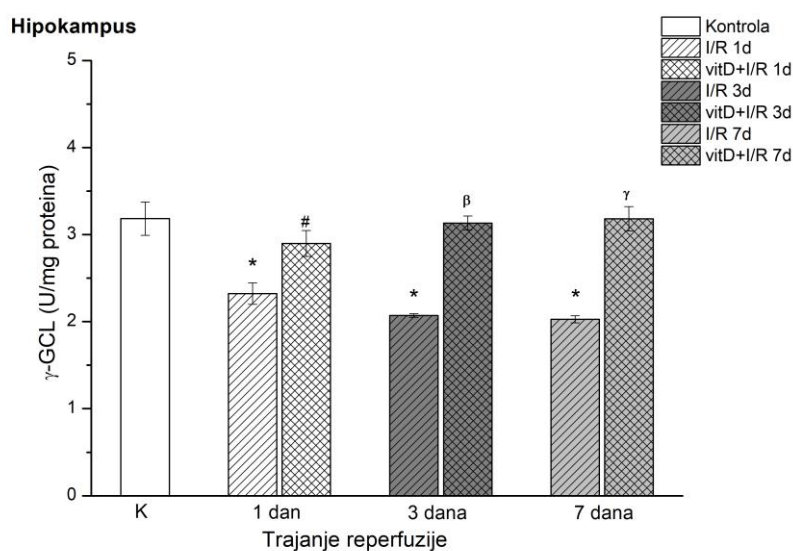
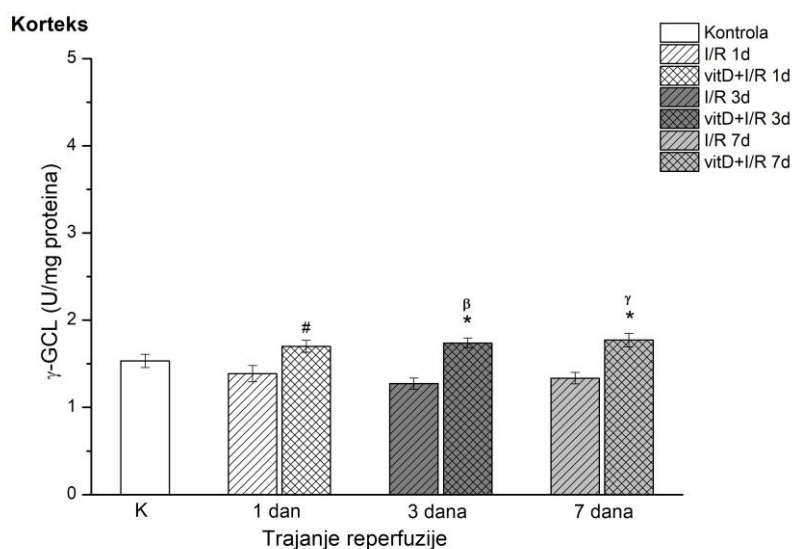
* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.

$p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.

α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.

β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.

γ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 7d grupe.



Grafik 7. Aktivnost gama glutamin-cistein ligaze (γ GCL) u neprečišćenoj sinaptozomalnoj frakciji korteksa i hipokampusa u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.

$p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.

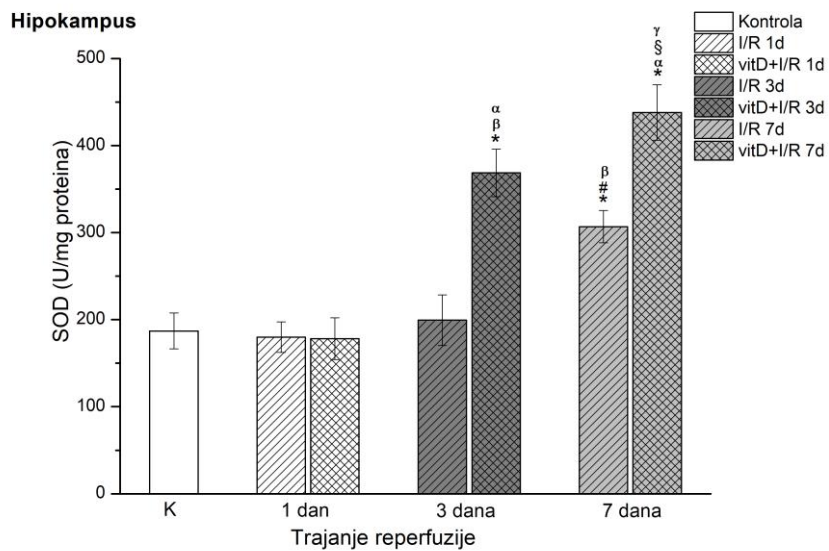
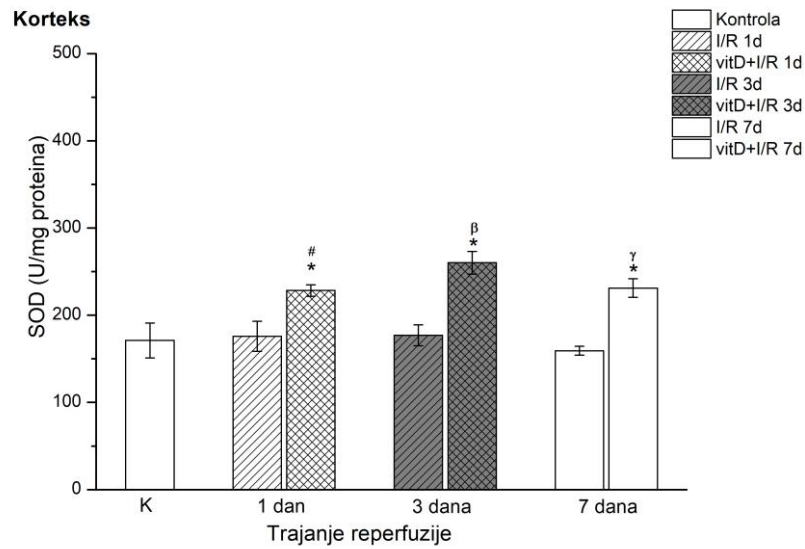
β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.

γ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 7d grupe.

4.1.4 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ukupnu aktivnost superoksid dizmutaze (SOD) i ekspresiju SOD1 i SOD2

Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u aktivnosti SOD u korteksu ($F_{6,36}=7,01$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,36}=16,87$; $p<0.05$) (Grafik 8). U korteksu aktivnost SOD je povišena u svim vitaminom D pretretiranim grupama u poređenju sa kontrolnom i odgovarajućom I/R grupom. U hipokampusu u grupi I/R 7d aktivnost SOD je značajno povišena u odnosu na kontrolnu, I/R 1d i 3d grupu. Statistički značajno povišena aktivnost SOD postoji i u vitD+I/R 3d i vitD+I/R 7d grupama u odnosu na kontrolnu, vitD+I/R 1d grupe i odgovarajuće I/R grupe.

Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u ekspresiji SOD1 u korteksu ($F_{6,36}=21,86$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,36}=51,07$; $p<0.05$) (Grafik 9). Ekspresija SOD1 u korteksu životinja I/R 1d grupe je značajno snižena u poređenju sa kontrolom, dok se u kasnijim fazama reperfuzije, I/R 3d i I/R 7d, ekspresija SOD1 vraća na kontrolne vrednosti i značajno je viša u odnosu na I/R 1d. U hipokampusu ekspresija SOD1 je statistički značajno snižena u svim I/R grupama u poređenju sa kontrolnom grupom. Vitamin D je u korteksu uticao na povećanje ekspresije SOD1 nakon prvog i sedmog dana reperfuzije, dok je u hipokampusu ovaj trend prisutan samo u trećem danu reperfuzije.



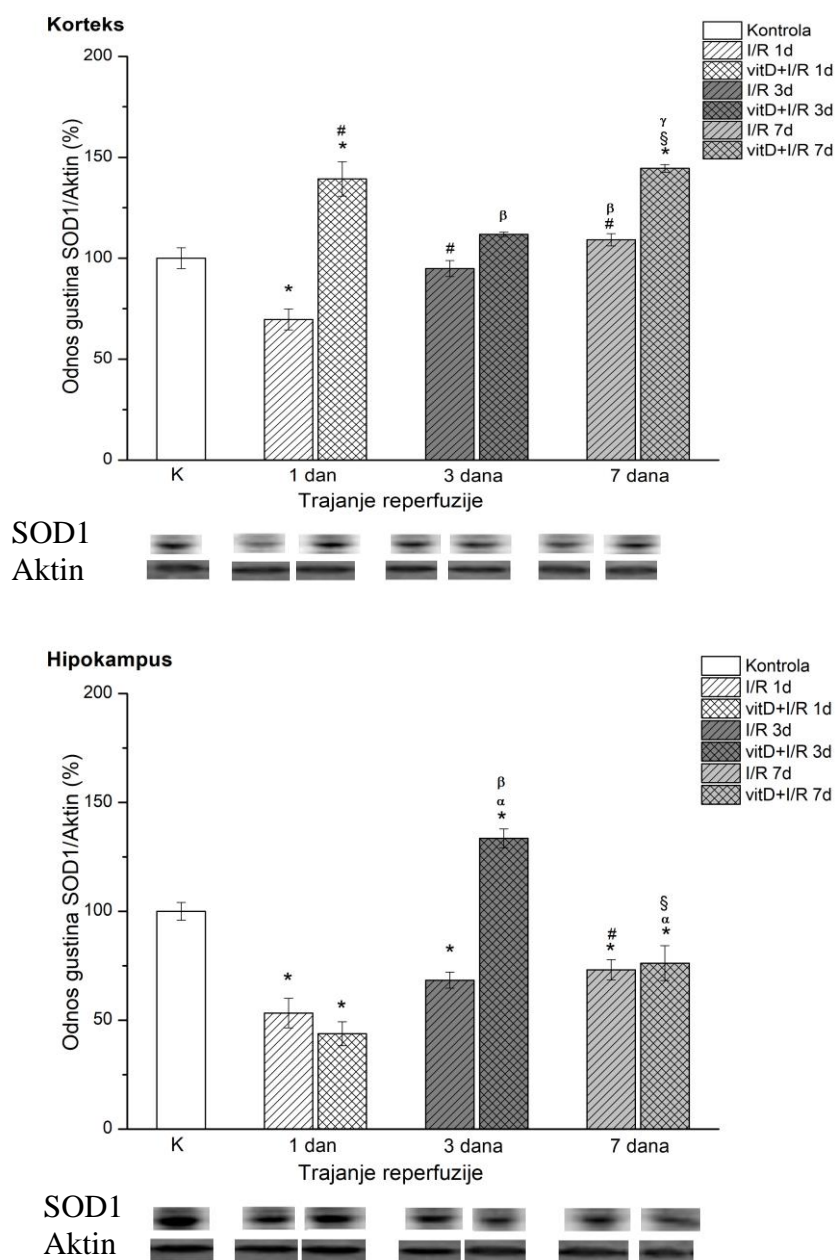
Grafik 8. Aktivnost superoksid dizmutaze (SOD) u neprečišćenju sinaptosomalnoj frakciji korteksa i hipokampusa u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.

$p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.

β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.

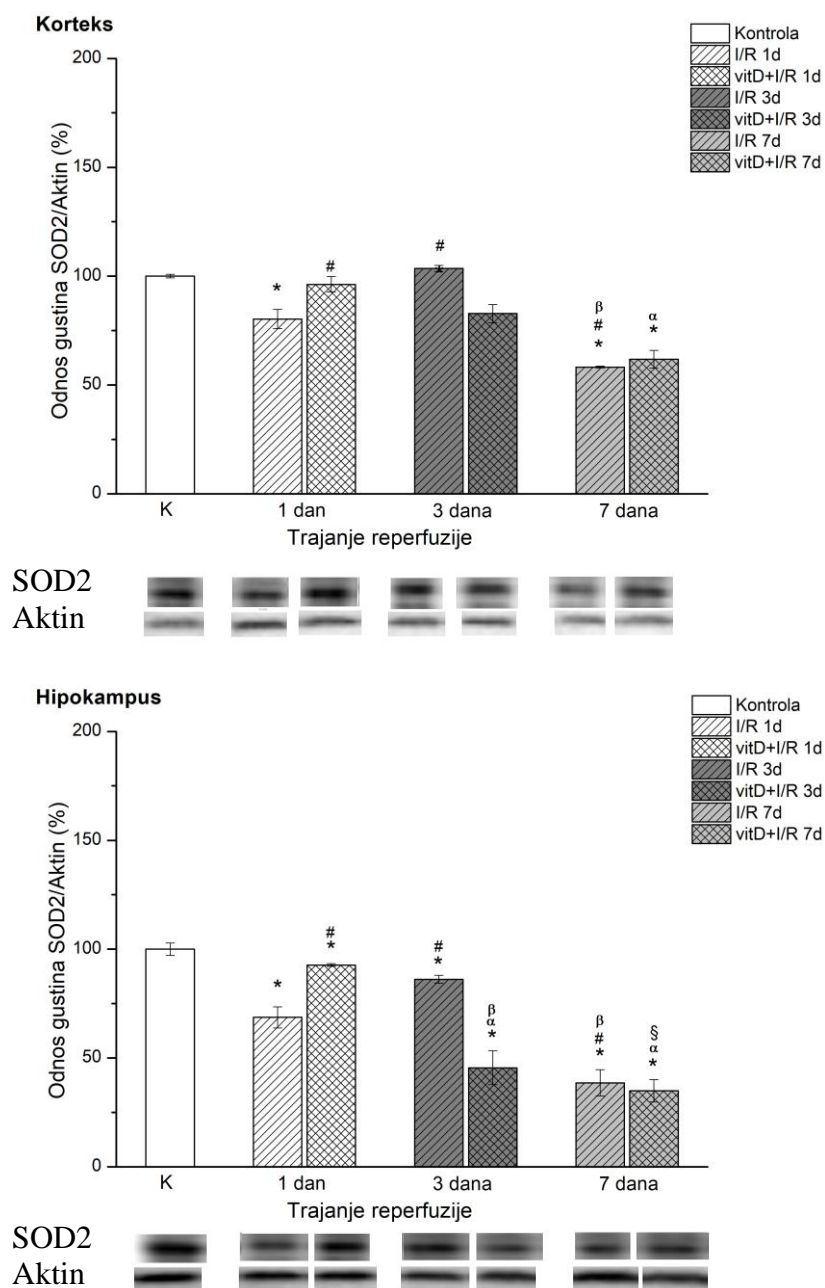
γ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 7d grupe.



Grafik 9. Ekspresija superoksid dizmutaze 1 (SOD1) u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

- * $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.
- # $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.
- β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.
- α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.
- γ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 7d grupe.
- § $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 3d grupe.

Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u ekspresiji SOD2 u korteksu ($F_{6,36}= 50,82$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,36}=119,21$; $p<0.05$) (Grafik 10). U korteksu u I/R 1d ekspresija SOD2 je statistički značajno snižena u odnosu na kontrolnu i vitD+I/R 1d grupu. Nakon tri dana reperfuzije ekspresija SOD2 se vraća na kontrolne vrednosti i značajno je viša u poređenju sa I/R 1d, dok u sedmom danu ekspresija opada i statistički je značajno niža u poređenju sa kontrolnom i drugim I/R grupama. U vitaminom D pretretiranim grupama promena ekspresije SOD2 je statistički značajno snižena u vitD+I/R 3d grupi u poređenju sa kontrolom, vitD+I/R 1d i I/R 3d, dok u grupi vitD+I/R 7d statistički značajna razlika postoji i u odnosu na vitD+I/R 3d grupu. U hipokampusu ekspresija SOD2 je statistički značajno niža u poređenju sa kontrolnom grupom u svim eksperimentalnim grupama. U I/R 1d prisutno je statistički značajno sniženje i u odnosu na vitD+I/R 1 d grupu. U trećem danu reperfuzije (I/R 3d) ekspresija SOD 2 se vraća na kontrolne vrednosti i znatno je viša od ekspresije u I/R 1d grupi. Međutim, nakon sedmog dana (I/R 7d) vrednosti ponovo opadaju i statistički su značajno niže i od I/R1d i od I/R 3d grupe. U vitD+I/R grupama vrednosti su bile niže od kontrolnih, a sa odmicanjem reperfuzije sve su se više snižavale, tako da postoji statistički značajna razlika između ovih grupa.



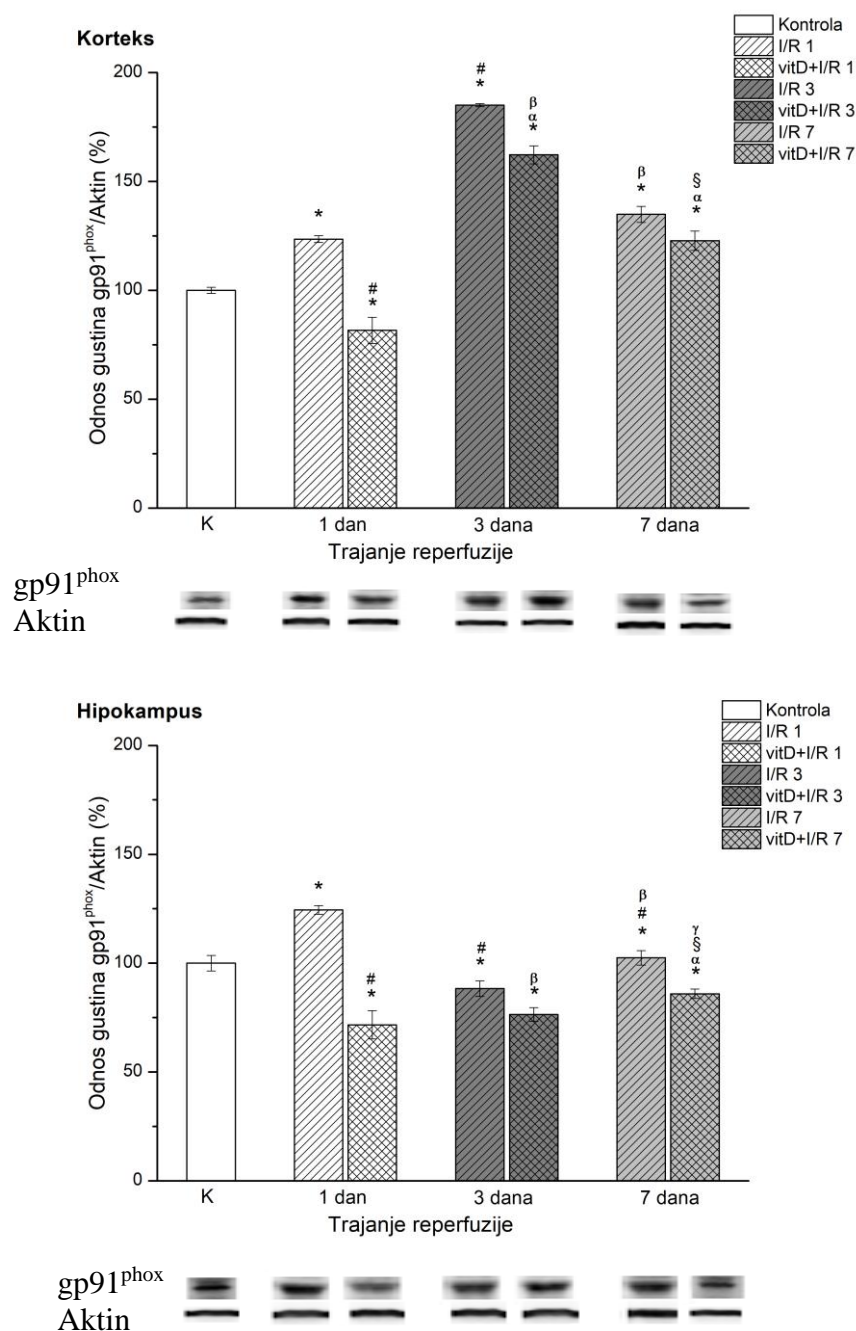
Grafik 10. Ekspresija SOD2 u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

- * $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.
- # $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.
- β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.
- α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.
- § $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 3d grupe.

4.1.5 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ekspresiju NADPH oksidaze

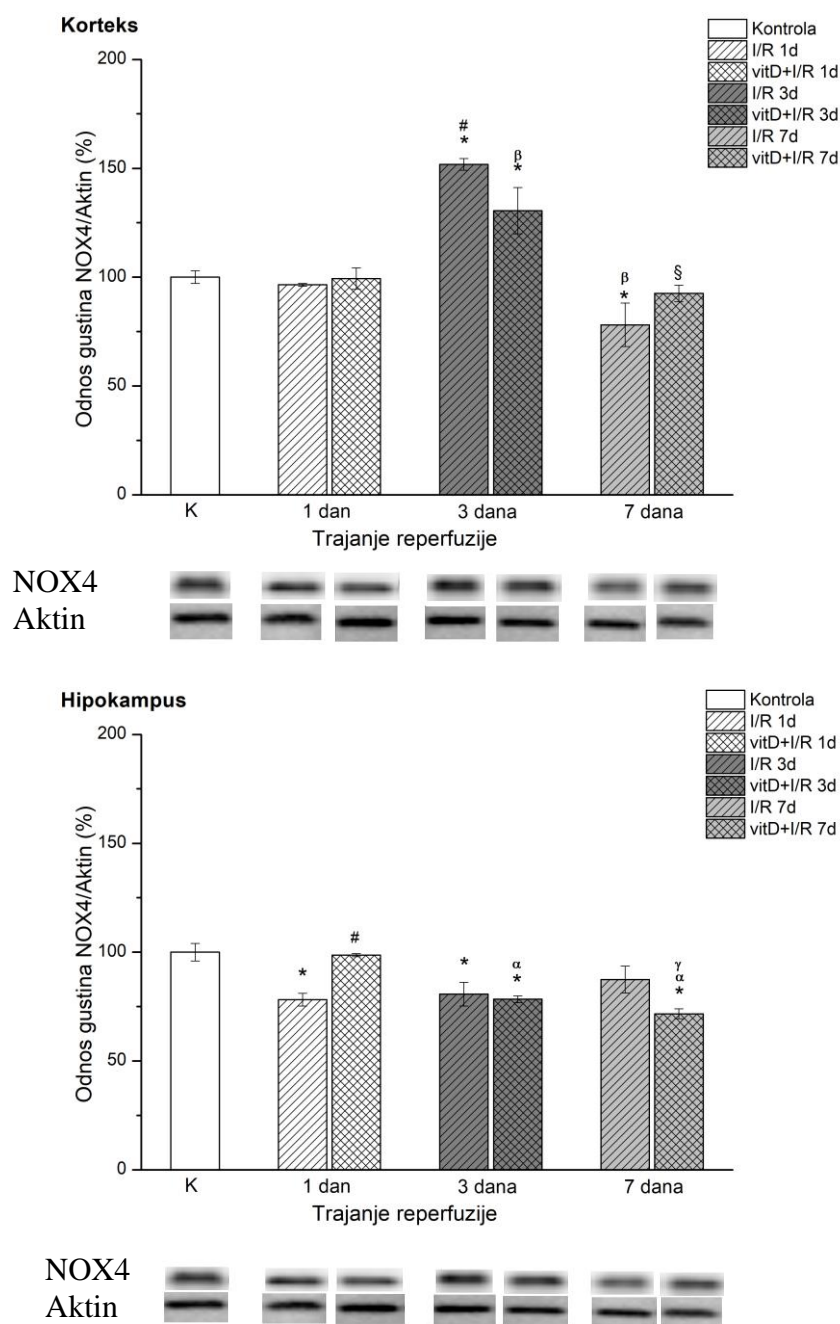
Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u ekspresiji NOX2 (gp91^{phox}) u korteksu ($F_{6,34}=66,62$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,34}=31,57$; $p<0.05$) (Grafik 11). U korteksu i hipokampusu u svim I/R grupama ekspresija NOX2 je statistički značajno veća u odnosu na kontrolu i odgovarajuće vitaminom D tretirane grupe. U I/R 3d grupi ekspresija je statistički značajno veća i u odnosu na I/R 1d, da bi se u I/R 7d ekspresija vratila na nivo I/R 1d. Vitamin D je uticao na statistički značajno sniženje ekspresije gp91^{phox} u vitD+I/R 1d grupi u odnosu na kontrolu. U vitD+I/R 3d i vitD+I/R 7d grupi ekspresija gp91^{phox} je statistički značajno veća u odnosu kontrolnu grupu i postoje statistički značajne razlike između vitaminom D tretiranih grupa. U hipokampusu u I/R 1d postoji statistički značajno povećanje ekspresije gp91^{phox} u odnosu na kontrolnu i vitD+I/R 1d grupu. U grupama I/R 3d i I/R 7d ova ekspresija je statistički značajno snižena, ali je i dalje značajno viša nego u odgovarajućim vitamin D tretiranim grupama. Vitamin D je u hipokampusu, u svim grupama, uticao na sniženje ekspresije NOX2 u odnosu na kontrolu.

Upotrebom ANOVA testa pokazana je razlika među ispitivanim grupama u ekspresiji NOX4 u korteksu ($F_{6,34}=11,75$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,34}=5,32$; $p<0.05$) (Grafik 12). U korteksu u I/R 3d i vitD+I/R 3d ekspresija NOX4 je značajno veća u poređenju sa kontrolnom i I/R 1d, odnosno vitD+I/R 1d grupom. U grupi I/R 7d ekspresija opada značajno ispod nivoa kontrole, dok se u grupi vitD+I/R 7d vraća na kontrolni nivo. U hipokampusu u I/R 1d i I/R 3d grupi ekspresija NOX4 je značajno niža u poređenju sa kontrolnom grupom. U I/R 1d ekspresija NOX4 je niža i od vitD+I/R 1d, dok je u I/R 7d viša nego u odgovarajućoj vitamin D grupi. Vitamin D je u trećem (vitD+I/R 3d) i sedmom (vitD+I/R 7d) danu reperfuzije uticao na niži nivo ekspresije NOX4 u poređenju sa kontrolnom i vitD+I/R 1d grupom.



Grafik 11. Ekspresija NOX2 (gp91^{phox}) u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

- * $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.
- # $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.
- β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.
- γ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 7d grupe.
- α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.
- δ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 3d grupe.

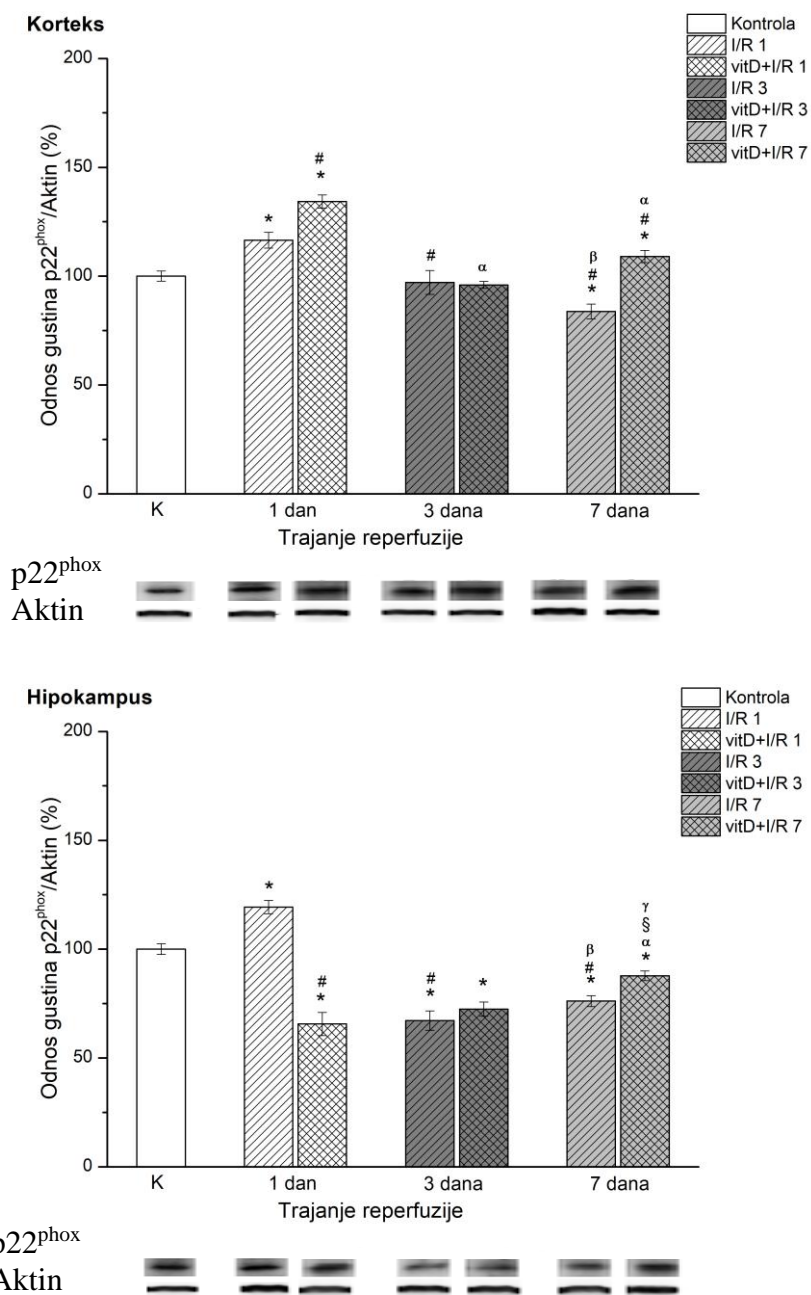


Grafik 12. Ekspresija NOX4 u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

- * $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.
- # $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.
- β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.
- γ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 7d grupe.
- α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.
- § $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 3d grupe.

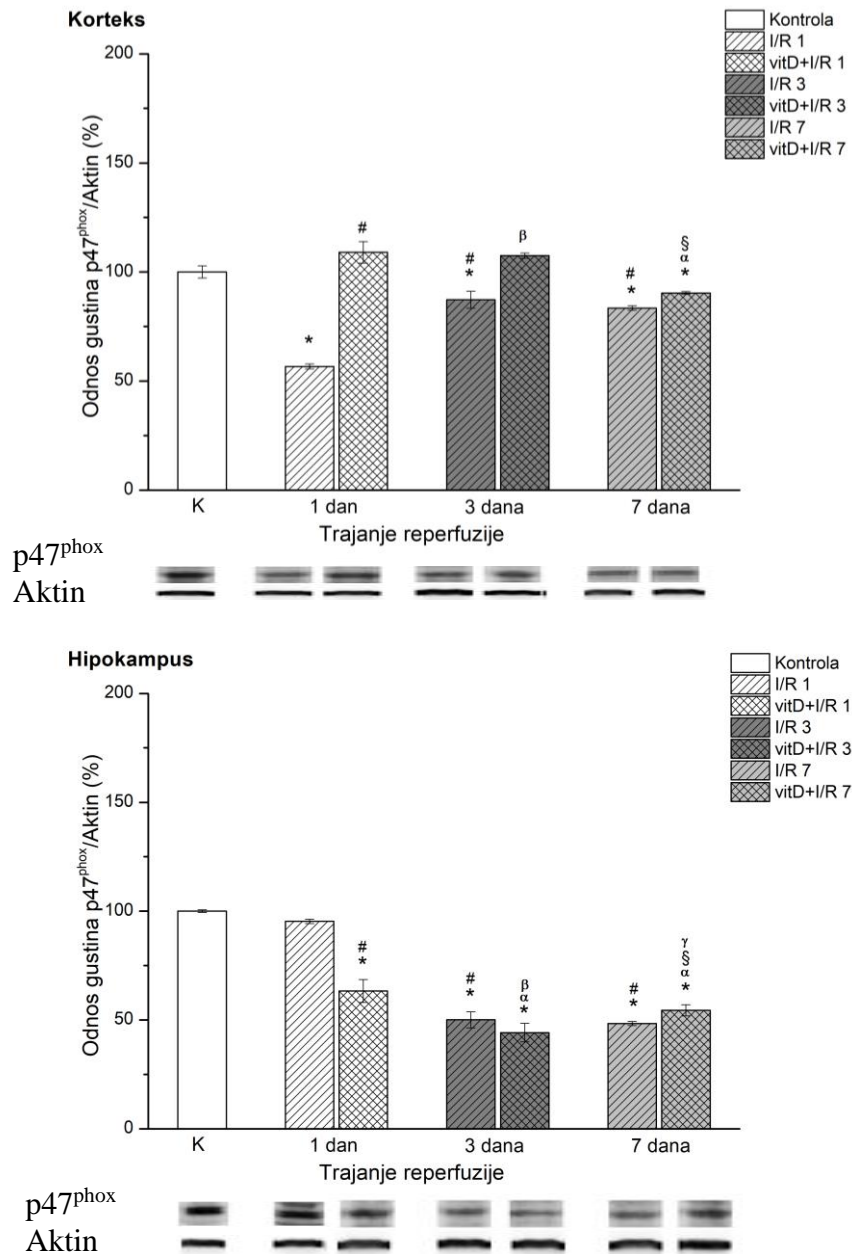
Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u ekspresiji $p22^{phox}$ u korteksu ($F_{6,34}=21,59$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,34}=50,47$; $p<0.05$) (Grafik 13). U korteksu eksperimentalnih životinja I/R 1d grupe ekspresija $p22^{phox}$ je statistički značajno povišena u odnosu na kontrolnu grupu da bi se vremenom snižavala, tako da je u I/R 3d grupi na nivou kontrolnih vrednosti, u I/R 7d statistički značajno niža od kontrole. U grupi vitD+I/R 1d ekspresija $p22^{phox}$ je statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu i I/R 1d grupu, dok je u vitD+I/R 3d ekspresija na nivou kontrolne grupe, a nakon 7 dana reperfuzije ona opet značajno raste u odnosu na kontrolnu i I/R 7d grupu. U hipokampusu ekspresija $p22^{phox}$ je statistički značajno povišena u I/R 1d grupi u odnosu na kontrolnu i vitD+I/R 1d grupu. Nakon trećeg dana reperfuzije ekspresija $p22^{phox}$ se snižava statistički značajno u odnosu na kontrolne vrednosti i na tom nivou ostaje i u I/R 7d grupi. Pretretman vitaminom D održava vrednosti $p22^{phox}$ statistički značajno nižim u odnosu na kontrolne vrednosti. U grupi vitD+I/R 7d ekspresija je statistički značajno viša u poređenju sa vitD+I/R 1d, vitD+I/R 3d i I/R 7d grupom.

Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u ekspresiji $p47^{phox}$ u korteksu ($F_{6,34}=44,54$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,34}=172,86$; $p<0.05$) (Grafik14). U korteksu u svim I/R grupama ekspresija $p47^{phox}$ je značajno niža u poređenju sa kontrolnom grupom, s tim da je u I/R 3d i I/R 7d veća u poređenju sa I/1d grupom. Takođe, u grupama I/R 1d i I/R 3d ekspresija je značajno niža u poređenju sa odgovarajućim vitaminom D pretretiranim grupama, dok se u sedmom danu reperfuzije ova razlika gubi. U grupi vitD+I/R 1d ekspresija $p47^{phox}$ je statistički značajno viša u odnosu na kontrolne vrednosti, u vitD+I/R 3d grupi vrednosti su izjednačene sa kontrolnim, dok je u vitD+I/R 7d ekspresija $p47^{phox}$ značajno niža u poređenju sa kontrolnom grupom. U hipokampusu u I/R 3d i I/R 7d grupama ekspresija ovog parametra je statistički značajno niža u poređenju sa kontrolom i I/R 1d grupom. U vitD+I/R 1d i vitD+I/R 3d grupama ekspresija $p47^{phox}$ je statistički značajno niža u poređenju sa kontrolnom i odgovarajućom I/R grupom. Međutim, u vitD+I/R 7d grupi prisutno je statistički značajno sniženje u poređenju sa kontrolom, mada je i dalje značajno viša u poređenju sa I/R 7d grupom.



Grafik 13. Ekspresija p22^{phox} u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

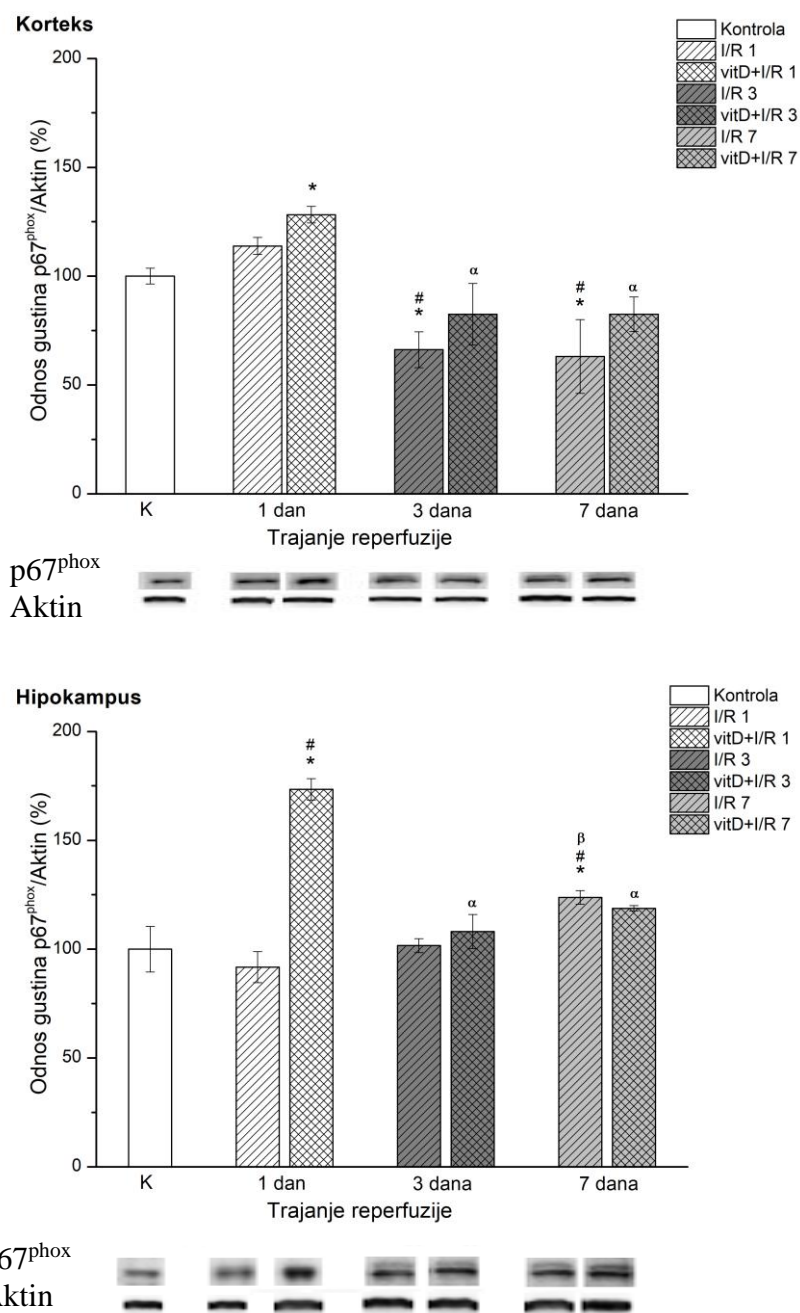
- * p<0.05 u odnosu na vrednost kontrolne grupe.
- # p<0.05 u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.
- β p<0.05 u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.
- γ p<0.05 u odnosu na vrednost I/R 7d grupe.
- α p<0.05 u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.
- § p<0.05 u odnosu na vrednost vitD+I/R 3d grupe.



Grafik 14. Ekspresija p47^{phox} u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

- * p<0.05 u odnosu na vrednost kontrolne grupe.
- # p<0.05 u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.
- β p<0.05 u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.
- γ p<0.05 u odnosu na vrednost I/R 7d grupe.
- α p<0.05 u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.
- § p<0.05 u odnosu na vrednost vitD+I/R 3d grupe.

Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u ekspresiji p67^{phox} u korteksu ($F_{6,34}=10,82$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,34}=16,16$; $p<0.05$) (Grafik 15). U korteksu u I/R 3d i I/R 7d grupi ekspresija p67^{phox} je značajno snižena u poređenju sa kontrolnom i I/R 1d grupom. U vitD+I/R 1d grupi ekspresija ovog parametra je značajno povišena u odnosu na kontrolnu grupu, ali se u trećem i sedmom danu reperfuzije održava na kontrolnim vrednostima. U hipokampusu u I/R 7d grupi ekspresija p67^{phox} je statistički značajno povišena u odnosu na kontrolu i druge I/R grupe. U vitD+I/R 1d grupi ekspresija je značajno veća u odnosu na kontrolu i I/R1d grupu, ali se kasnije tokom reperfuzije vraća na kontrolne vrednosti.



Grafik 15. Ekspresija p67^{phox} u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

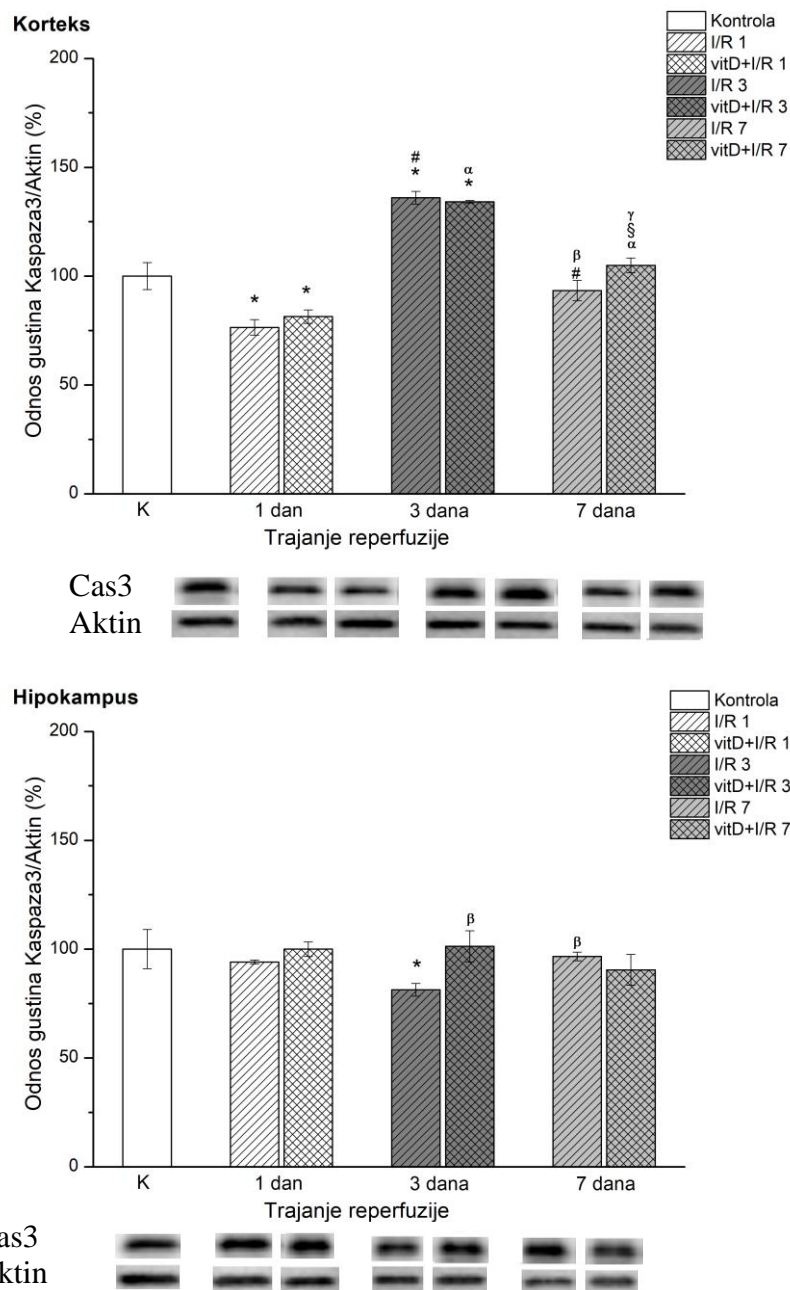
- * $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.
- # $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.
- β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.
- α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.

4.2 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na pokazatelje apoptoze i autofagije u korteksu i hipokampusu džerbila

4.2.1 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ekspresiju kaspaze 3 i faktora indukcije apoptoze (AIF)

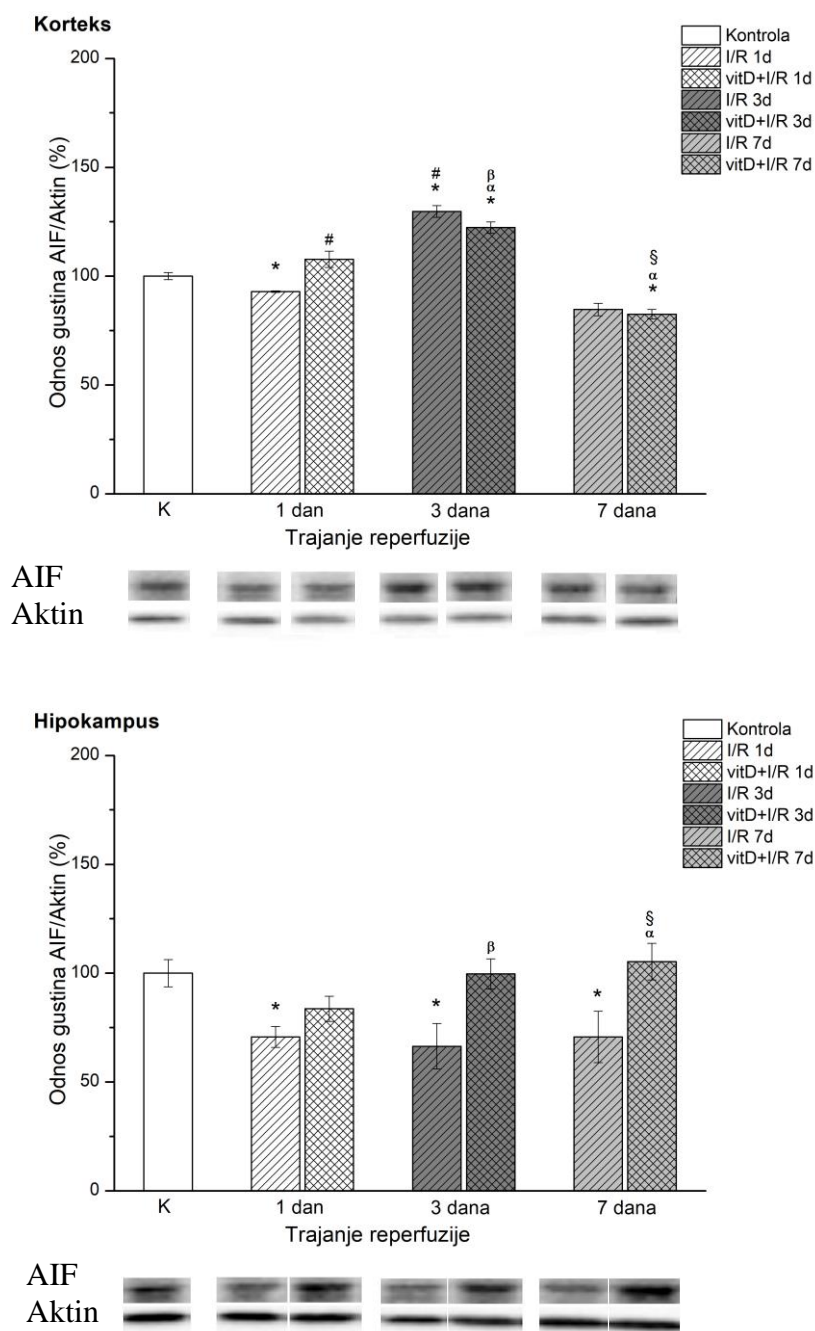
Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u ekspresiji kaspaze 3 (Cas3) u korteksu ($F_{6,34}=39,01$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,32}=2,25$; $p<0.05$) (Grafik 16). U korteksu džerbila nakon jednog dana reperfuzije i u I/R i vitD+I/R dolazi do statističkog pada ekspresije Cas3 u poređenju sa kontrolnom grupom. Treći dan reperfuzije je praćen statistički značajnim porastom ekspresije u odnosu na kontrolnu i I/R 1d, odnosno vitD+I/R 1d grupu. U sedmom danu reperfuzije ekspresija se vraća na kontrolni nivo, ali je u grupi vitD+I/R 7d statistički značajno viša u poređenju sa I/R 7d. U hipokampusu džerbila ekspresija Cas3 je bila statistički značajno snižena u vitD+I/R 3d grupi u odnosu na kontrolnu grupu.

Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u ekspresiji AIF proteina u korteksu ($F_{6,34}=49,94$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,34}=5,91$; $p<0.05$) (Grafik 17). U korteksu džerbila ekspresija AIF proteina je značajno snižena u I/R 1d grupi u poređenju sa kontrolnom i vitD+I/R 1d grupom. Nakon tri dana reperfuzije, u I/R 3d grupi, nalazimo da je ekspresija značajno viša u poređenju sa kontrolnom, I/R 1d i vitD+I/R 3d grupom, dok u sedmom danu reperfuzije (I/R 7d) ekspresija ovog proteina opada značajno u odnosu na kontrolu i I/R 1d i I/R 3d grupu. Kod vitaminom D pretretiranih džerbila nakon tri i sedam dana reperfuzije promene vidimo prvo u vidu porasta, a zatim pada vrednosti u odnosu na kontrolnu i vitD+I/R 1d grupu. U hipokampusu ekspresija u svim I/R grupama je statistički značajno snižena u poređenju sa kontrolnom grupom. U I/R 3d postoji statistički značajna razlika i u poređenju sa vitD+I/R 3d grupom. U svim vitaminom D tretiranim grupama ekspresija AIF-a u hipokampusu je ostala na nivou ekspresije kontrole, s tim da je u grupi vitD+I/R 7d ekspresija statistički značajno veća u poređenju sa druge dve vitamin D grupe.



Grafik 16. Ekspresija kaspaze 3 u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

- * $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.
- # $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.
- β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.
- γ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 7d grupe.
- α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.
- § $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 3d grupe.



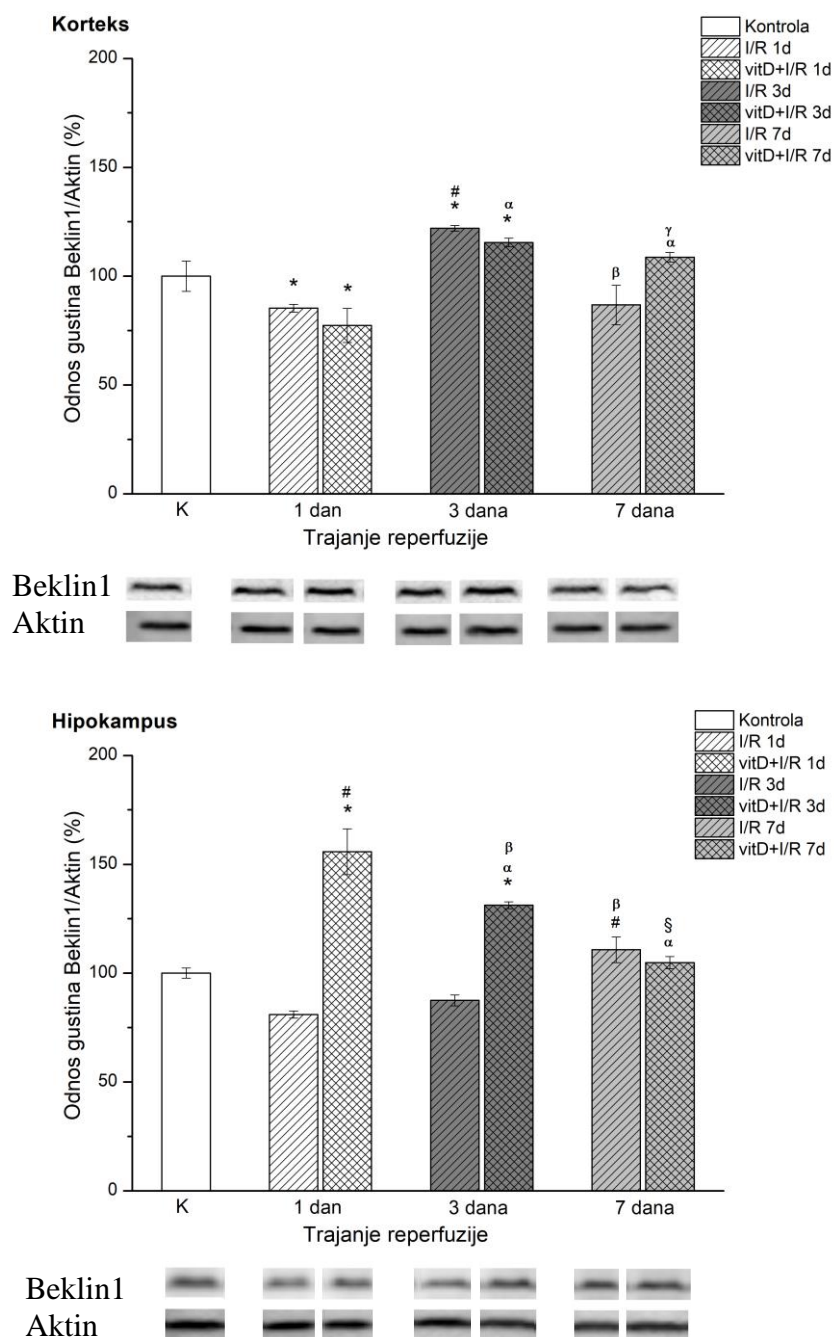
Grafik 17. Ekspresija AIF u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

- * $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi kontrolne grupe.
- # $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi I/R 1d grupe.
- β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi I/R 3d grupe.
- α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi vitD+I/R 1d grupe.
- \S $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi vitD+I/R 3d grupe.

4.2.2 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ekspresiju beklina 1, p62 i LC3 proteina

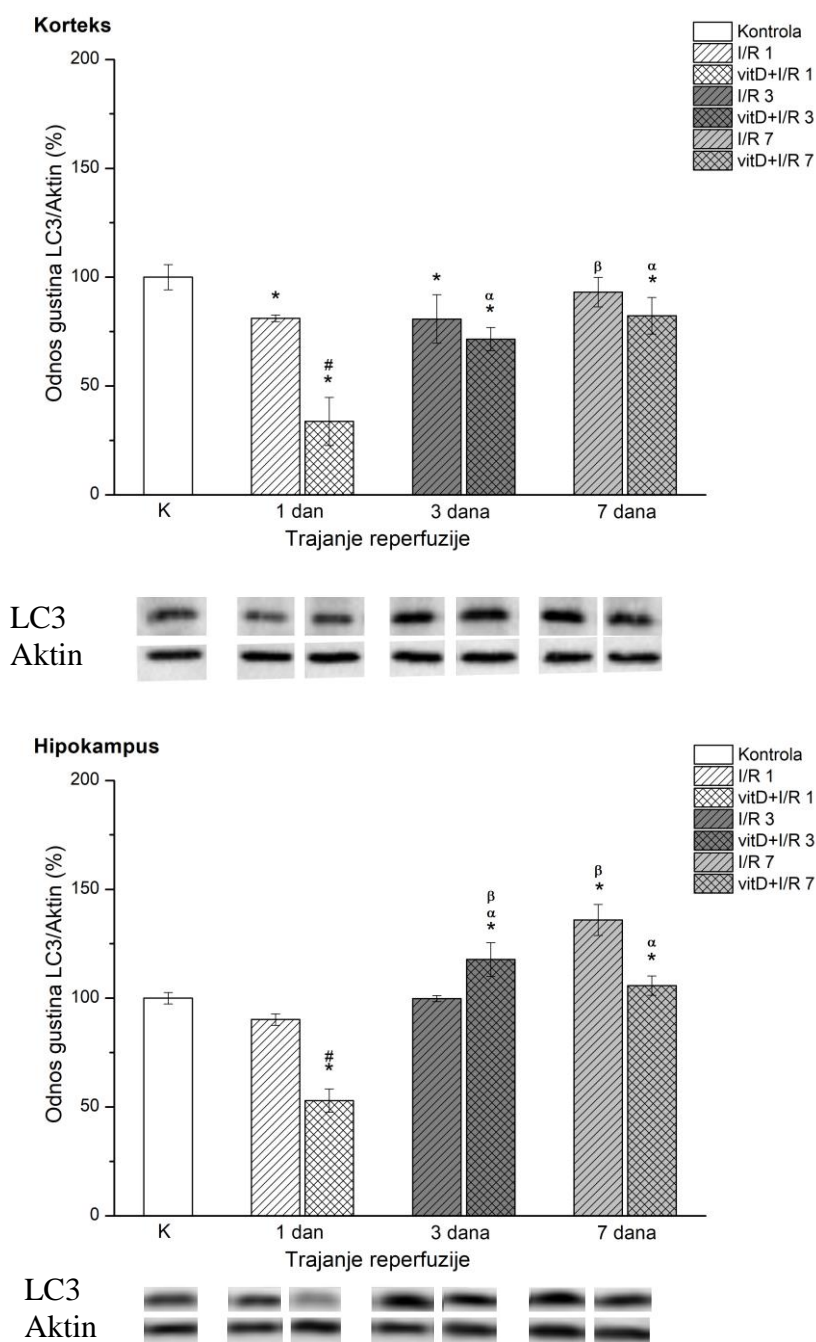
Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u ekspresiji beklina 1 u korteksu ($F_{6,34}=12,21$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,34}=13,92$; $p<0.05$) (Grafik 18). U korteksu u I/R 1d i vitD+I/R 1d grupi ekspresija beklina 1 je statistički značajno snižena u odnosu na kontrolu, u trećem danu reperfuzije je statistički značajno povišena, dok se sedmog dana reperfuzije ekspresija beklina 1 u obe grupe vraća na vrednosti kontrolne grupe, s tim da je ekspresija statistički značajno povišena u vitD+I/R 7d grupi u odnosu na I/R 7d grupu. U hipokampusu u I/R 7d grupi ekspresija beklina 1 je značajno povišena u odnosu na I/R 1d i I/R 3d grupu. U grupama tretiranim vitaminom D nakon jednog i tri dana reperfuzije ekspresija ovog proteina je statistički značajno viša u odnosu na kontrolu i I/R 1d, odnosno I/R 3d grupu. U vitD+I/R 3d grupi ekspresija je značajno niža u poređenju sa vitD+I/R 1d grupom, da bi se u vitD+I/R 7d vratila na kontrolne vrednosti.

Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u ekspresiji LC3 proteina u korteksu ($F_{6,34}=13,86$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,34}=20,66$; $p<0.05$) životinja (Grafik 19). U korteksu u prvom danu reperfuzije ekspresija u obe grupe je statistički značajno snižena u poređenju sa kontrolnom grupom. Takođe, ekspresija je statistički značajno niža u vitD+I/R 1d grupi i postoji statistički značajna razlika u odnosu na I/R 1d grupu. U trećem danu reperfuzije u obe grupe prisutna je statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu i I/R 1d, odnosno vitD+I/R 1d. Ekspresija u vitD+I/R 3d grupi značajno je veća u odnosu na vitD+I/R 1d. U sedmom danu ekspresija LC3 u I/R 7d grupi se izjednačava, dok u vitamin D grupi ostaje značajno niža od kontrole. U hipokampusu u vitD+I/R 1d grupi ekspresija LC3 je značajno niža od ekspresije u kontrolnoj i I/R 1d grupi. U vitD+I/R 3d grupi ekspresija je statistički značajno viša u odnosu na kontrolu, vitD+I/R 1d i I/R 3d grupu. U sedmom danu vitaminom D pretretirana grupa zadržava ovaj trend promene ekspresije LC3, ali dolazi i do porasta ekspresije u I/R 7d grupi u odnosu na kontrolu i I/R 3d grupu.



Grafik 18. Ekspresija beklina 1 u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

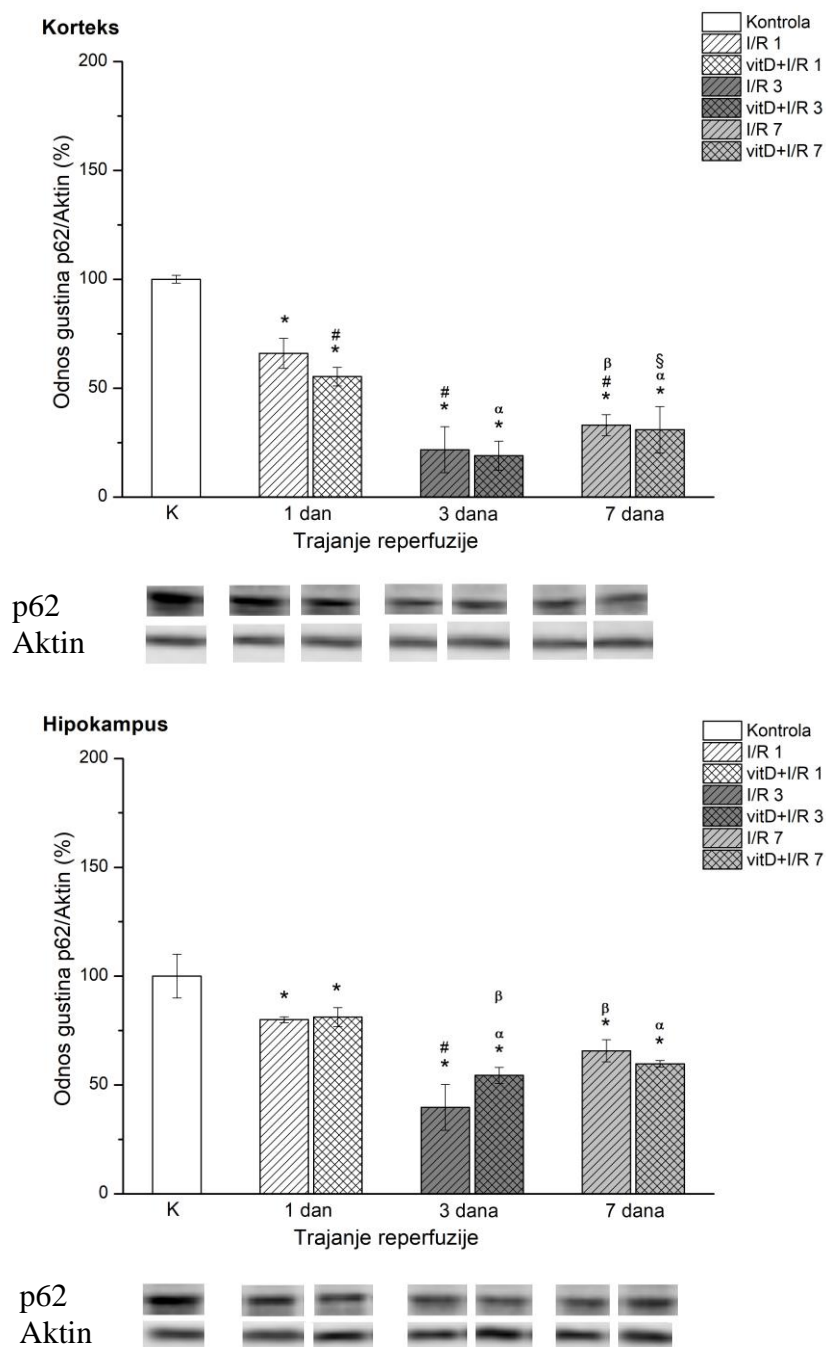
- * $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.
- # $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.
- β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.
- γ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 7d grupe.
- α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.
- § $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 3d grupe.



Grafik 19. Ekspresija LC3 u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.
 α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.
 β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.
 $\#$ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.

Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u ekspresiji p62 proteina u korteksu ($F_{6,34}=119,40$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,34}=15,73$; $p<0.05$) (Grafik 20). U korteksu u prvom danu reperfuzije ekspresija u obe grupe je statistički značajno snižena u poređenju sa kontrolnom grupom. Takođe, ekspresija je statistički značajno niža u vitD+I/R 1d grupi u odnosu na I/R 1d grupu. U trećem danu reperfuzije u obe grupe prisutna je statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu i I/R 1d, odnosno vitD+I/R 1d grupu. U sedmom danu reperfuzije ekspresija raste značajno u poređenju sa trećim danom, ali je i dalje statistički značajno snižena u odnosu na kontrolnu i I/R 1d, odnosno vitD+I/R 1d. U hipokampusu u eksperimentalnim grupama postoji statistički značajno sniženje ekspresije p62 u odnosu na kontrolu.

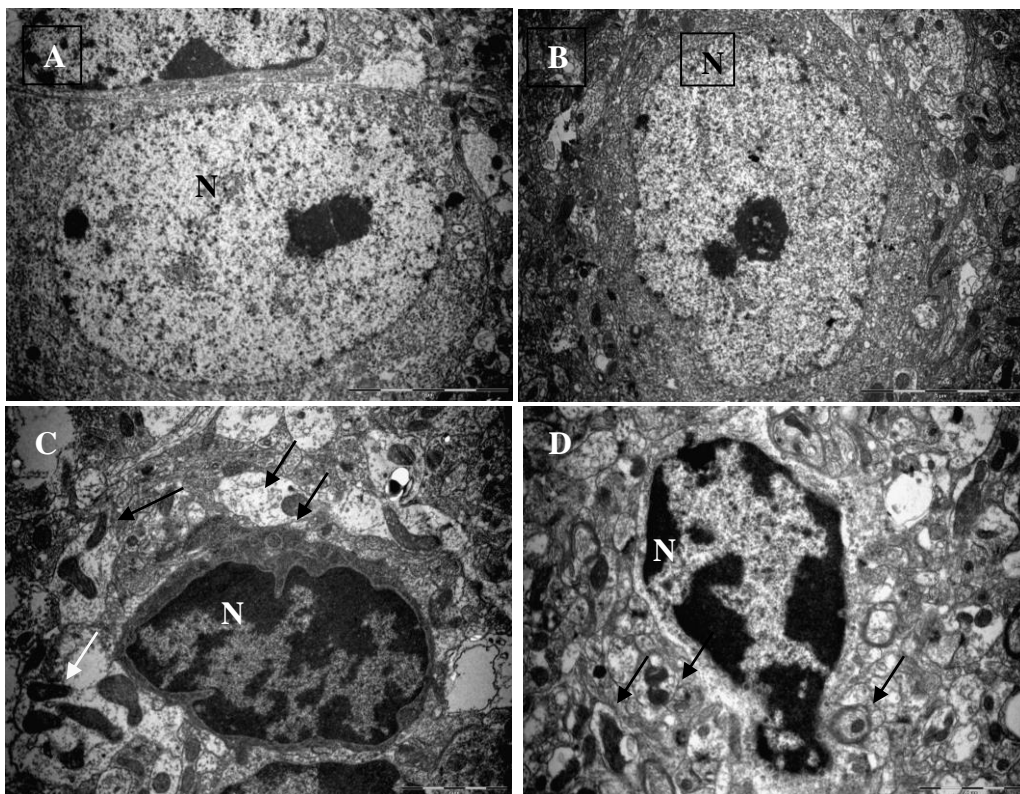


Grafik 20. Ekspresija p62 u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

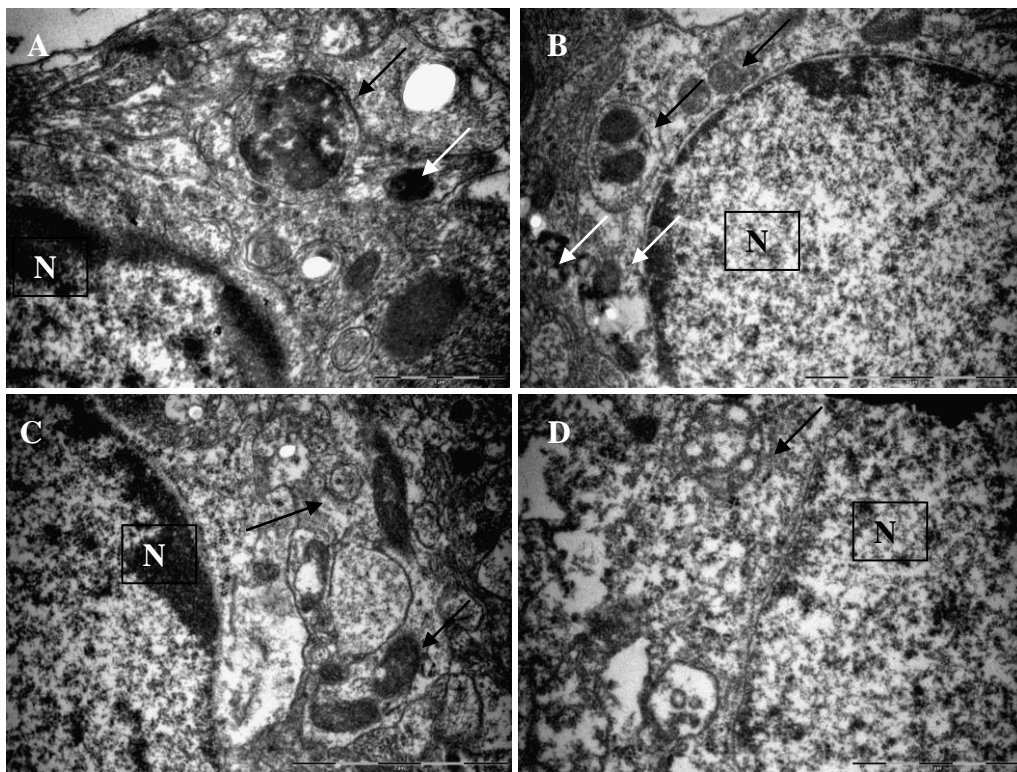
- * $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.
- # $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.
- β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.
- α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.
- § $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 3d grupe.

4.2.3 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ultrastrukturne promene u mozgu džerbila

Ispitivanje ultrastrukturnih promena u korteksu i hipokampusu džerbila vršeno je upotrebom transmisionog elektronskog mikroskopa (TEM). Promene su praćene nakon reperfuzije u trajanju od jednog, tri ili sedam dana u korteksu i hipokampusu pacova. U mozgovima kontrolnih jedinki prisutni su neuroni sa euhromatinskim jedrom, mitohondrijama normalne strukture i bez znakova oštećenja ili bubrenja (Slika 1.A i 1.B). Analize dobijenih rezultata su pokazale da u korteksu džerbila izloženih prolaznoj globalnoj ishemiji i reperfuziji u trajanju od tri dana dolazi do aktivacije unutrašnjeg puta apoptoze u obe grupe, što se može uočiti na slici 1.C (I/R 3d) i 1.D (vitD+I/R 3d). Na ovim mikrografijama vidi se marginalizacija jedarnog hromatina i vakuolizacija citoplazme. U svim grupama izloženim prolaznoj globalnoj ishemiji i reperfuziji u obe ispitivane strukture došlo je do aktivacije procesa autofagije, što je ispraćeno narušenom arhitektonikom ćelije, sa brojnim autofagnim vakuolama sa fagocitovanim sadržajem i kondenzovanim, tamnim mitohondrijama koje su izgubile jasnu granicu između spoljašnje i unutrašnje membrane u korteksu (Slika 2.A (I/R) i 2.B (vitD+I/R)) i hipokampusu (Slika 2.C (I/R) i 2.D (vitD+I/R)).



Slika 1. (A) i (B) U mozgu kontrolnih životinja, ćelije ispoljavaju normalne morfološke karakteristike. Zapaža se euhromatinski nukleus, mala količina granulisanog endoplazmatičnog retikuluma i mitohondrije (Bar = 5 μ m). (C) U kortikalnim regionima životinja izloženih I/R posle tri dana reperfuzije uočava se marginalizacija jedarne membrane, kao i brojne vakuole (crne strelice) rasute po citoplazmi sa fagocitovanim mitohondrijama u kasnoj fazi degeneracije koje su tamne, kondenzovane, bez jasne granice između spoljašnje u unutrašnje membrane (bele strelice) (Bar = 2 μ m) (D) U kortikalnim regionima životinja tretiranih vitaminom D pre I/R se nakon tri dana reperfuzije uočava početak procesa apoptoze praćen marginalizacijom jedarne membrane i vakuolizacijom citoplazme (Bar = 2 μ m) N-nukleus



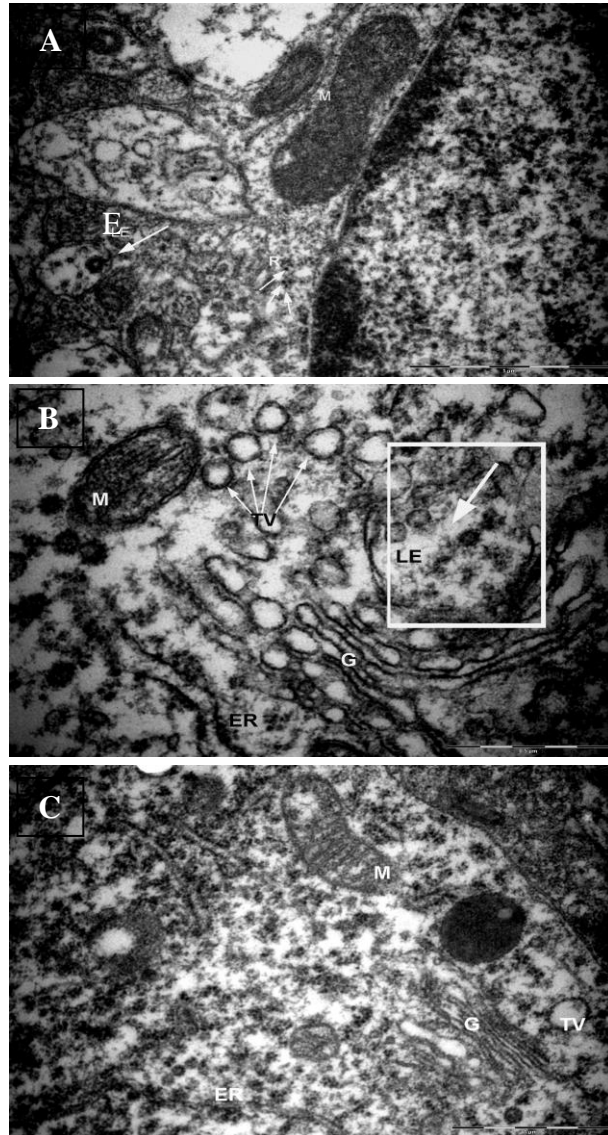
Slika 2. (A) U kortikalnim regionima džerbila izloženih I/R u svim fazama reperfuzije uočavaju se ćelije sa intaktnim jedrom i autofagozomima (strelice) (Bar = 1 μ m) (B) u grupama tretiranim vitaminom D pre I/R zapažaju se takođe ćelije sa intaktnim jedrom i autofagozomima (strelice) (Bar = 2 μ m) (C) U hipokampalnim regionima džerbila izloženih I/R uočavaju se ćelije sa intaktnim jedrom, autofagozomima i tamnim, kondenzovanim mitohondrijama (strelice). (Bar = 2 μ m). (D) U hipokampusu džerbila tretiranih vitaminom D pre izlaganja I/R uočavaju se ćelije sa intaktnom jedarnom membranom i autofagozomima (strelice) (Bar = 1 μ m) M-mitohondrija; N-nukleus

4.3 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na zastupljenost neurona, astrocita i miktroglije u korteksu i hipokampusu džerbila

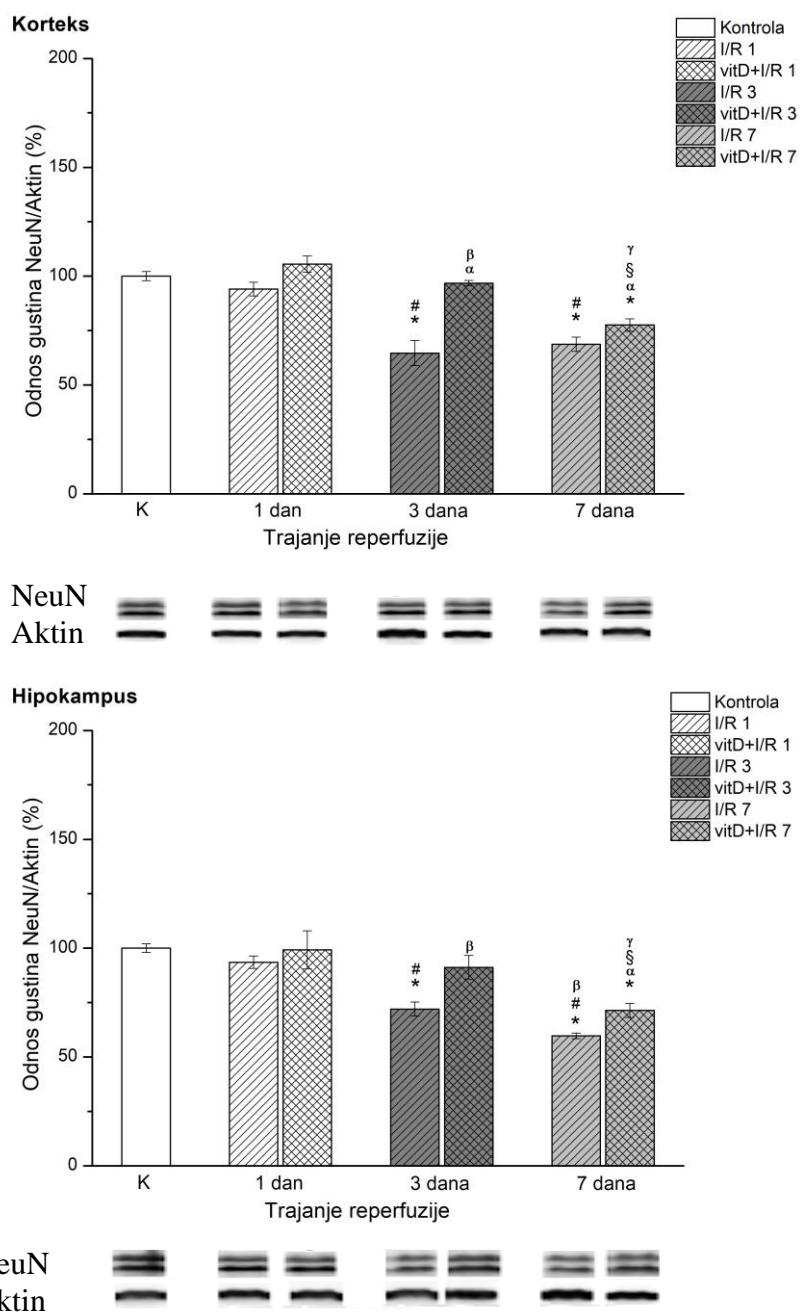
Pratili smo efekte globalne ishemije i reperfuzije u trajanju od jednog, tri ili sedam dana i uticaj pretretmana vitaminom D na ekspresiju markera ćelija CNS-a. Praćena je ekspresija neuron-specifičnog jedarnog proteina (NeuN), parvalbumina (PV), glijalnog kiselog fibrilarnog proteina (GFAP) i jonizovanog kalcijum-vezujućeg adapterskog proteina (Iba1) u korteksu i hipokampusu pacova imunohistohemijskim bojenjem i tehnikom Western blot.

4.3.1 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ekspresiju NeuN i broj NeuN+ neurona u korteksu i hipokampusu džerbila

Upotrebom ANOVA testa na rezultate dobijene Western blot analizom pokazana je razlika među ispitivanim grupama u ekspresiji NeuN proteina u korteksu ($F_{6,34}=7,99$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,34}=90,40$; $p<0.05$) ispitivanih grupa životinja (Grafik 21). U korteksu i hipokampusu džerbila I/R 1d grupe nije zapažena razlika u ekspresiji NeuN markera u odnosu na kontrolnu grupu, dok je u trećem i sedmom danu reperfuzije došlo do statistički značajnog sniženja ekspresije ovog markera u poređenju sa kontrolnom i I/R 1d grupom. U obe strukture u prvom i trećem danu reperfuzije ekspresija u vitamin D pretretiranim grupama je bila na nivou kontrole, dok je u sedmom danu bila statistički značajno snižena u odnosu na kontrolu, ali značajno viša u poređenju sa I/R 7d grupom. Upotrebom TEM-a otkrivene su suptilne subćelijske promene u obliku akumulacije transportnih vezikula i rupture membrane kasnih endozoma u ćelijama džerbila podvrgnutih I/R 1d. Ove promene su bile manje u mozgu džerbila tretiranih vitaminom D pre izvođenja I/R (Slika 3.)



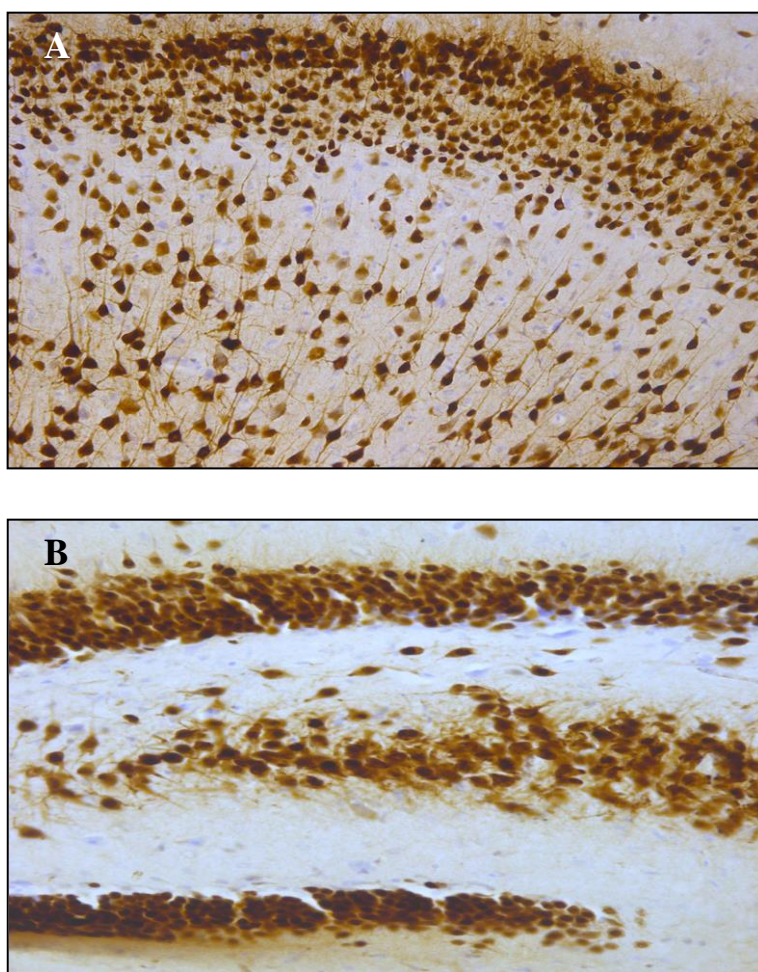
Slika 3. TEM prikaz neurona u: **(A)** kontrolnoj grupi na kojoj je strelicom obeležen kasni endozom (E) sa intaktnom membranom i mitohondrija (M) (Bar = 1 μ m); **(B)** u I/R 1d grupi se vidi kasni endozom sa rupturom membrane i akumulacija transportnih vezikula (TV), Goldžijev aparat (G) i granulisani endoplazmatski retikulum (ER) (Bar = 0,5 μ m); **(C)** u vitD+I/R 1d grupi prikazan je intaktan endozom, vezikule, Goldžijev aparat (G) i granulisani endoplazmatski retikulum (ER) i transportna vezikula (TV) (Bar = 1 μ m).



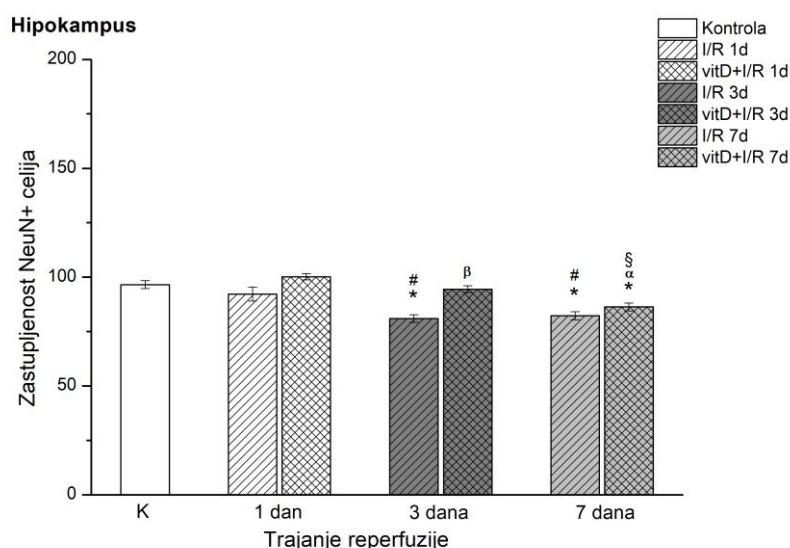
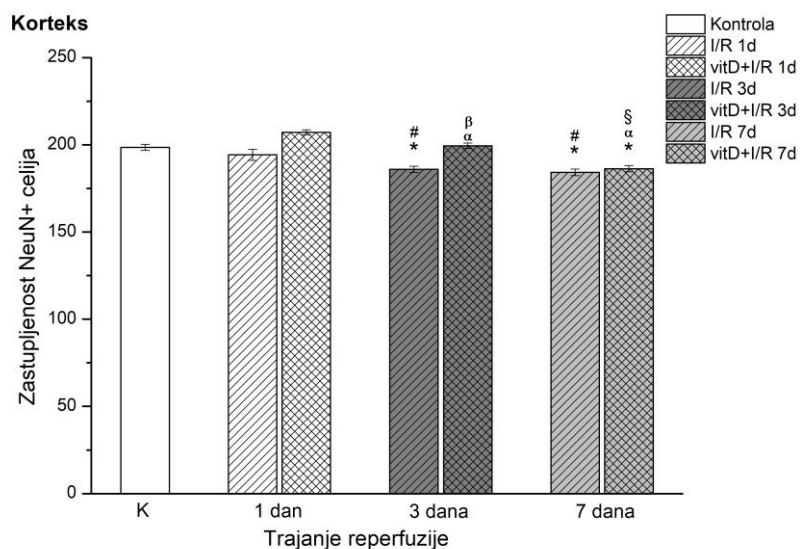
Grafik 21. Ekspresija neuron-specifičnog jedarnog proteina (NeuN) u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

- * $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.
- α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.
- β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.
- γ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 7d grupe.
- # $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.
- § $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 3d grupe.

Imunohistohemijским bojenjem smo pratili zastupljenost NeuN+ ćelija u mozgu. Na slici 4. predstavljeno je reprezentativno imunohistohemijско bojenje NeuN+ ćelija u korteksu i hipokampusu kontrolne grupe. Statistička analiza rezultata zastupljenosti NeuN+ ćelija obostrano u korteksu i hipokampusu na po šest vidnih polja na uveličanju 200x prikazana je grafički. Analizom rezultata detektovana je redukcija broja NeuN+ ćelija u korteksu i hipokampusu (Grafik 22) u I/R 3d, I/R 7d i vitD+I/R 7d grupi. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima proteinske ekspresije dobijene Western blot analizom.



Slika 4. Reprezentativni prikaz imunohistohemijskog bojenja NeuN+ ćelija u korteksu (A) i hipokampusu (B) džerbila kontrolne grupe na uveličanju 200x.



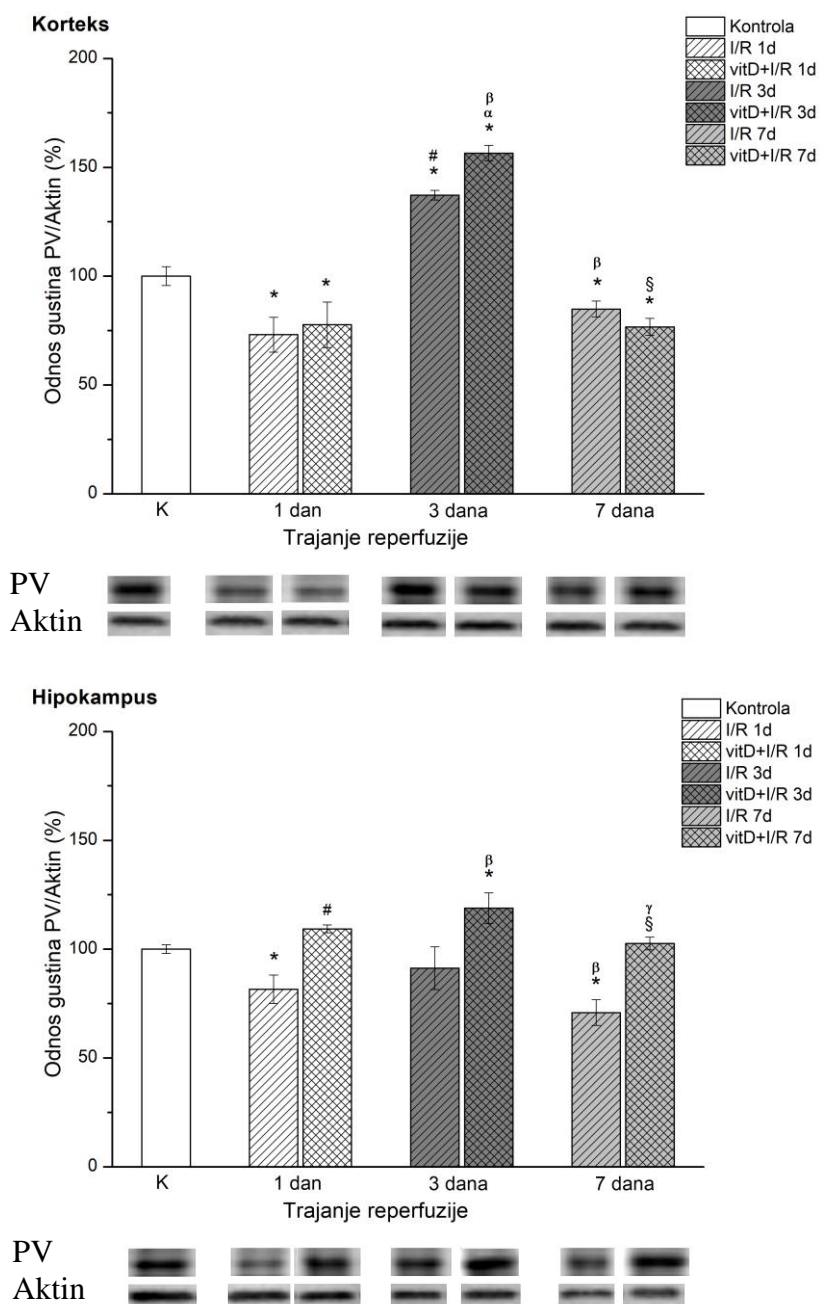
Grafik 22. Uticaj pretretmana vitaminom D i prolazne globalne ishemije i reperfuzije na zastupljenost NeuN+ ćelija u korteksu i hipokampusu džerbila. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

- * $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.
- # $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.
- β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.
- α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.
- § $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 3d grupe.

4.3.2 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ekspresiju parvalbumina i broj PV+ pozitivnih neurona u korteksu i hipokampusu džerbila

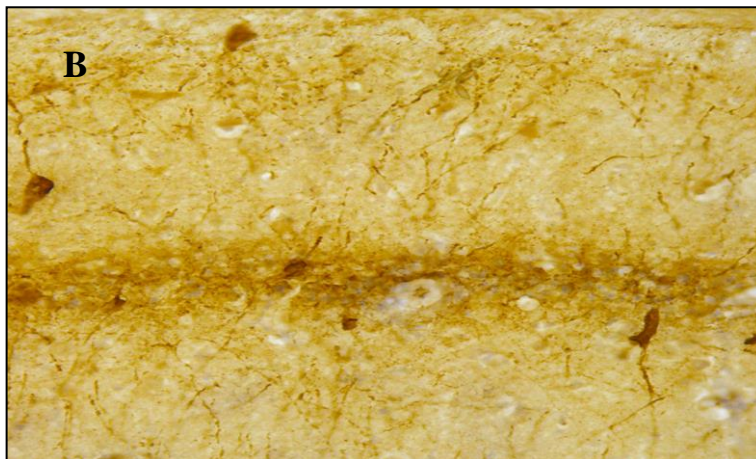
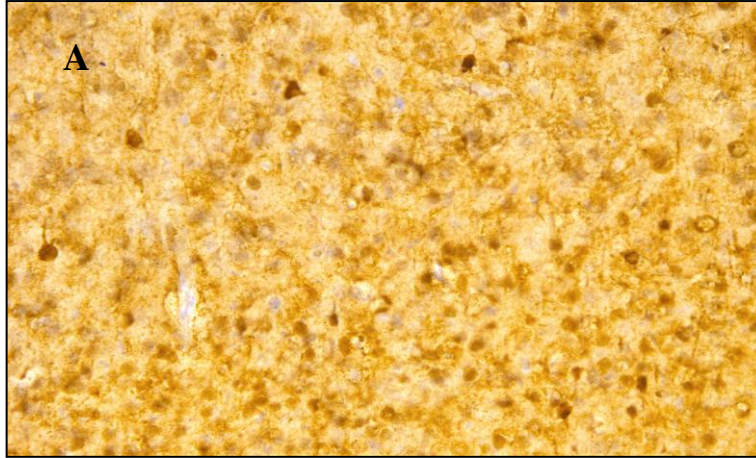
Upotrebom ANOVA testa utvrđena je razlika među ispitivanim grupama u ekspresiji PV proteina u korteksu ($F_{6,34}=42,76$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,34}=8,91$; $p<0.05$) (Grafik 23). U korteksu džerbila nakon jednog dana reperfuzije u obe grupe ekspresija PV je statistički značajno snižena. U trećem danu reperfuzije dolazi do porasta vrednosti ekspresije u obe grupe u odnosu na kontrolnu i I/R 1d, odnosno vitD+I/R 1d grupu. Takođe, postoji i statistički značajna razlika između I/R 1d i vitD+I/R 1d grupe. Sedmog dana reperfuzije ekspresija u obe grupe biva statistički značajno niža od kontrolne. U hipokampusu ekspresija u I/R 1d i I/R 7d je statistički značajno niža u poređenju sa kontrolom i vitD+I/R 1d, odnosno vitD+I/R 7d. U vitD+I/R 3d grupi ekspresija ovog markera je značajno viša u poređenju sa kontrolom i I/R 3d grupom.

Imunohistohemijским bojenjem smo pratili zastupljenost interneurona u mozgu džerbila, određivanjem zastupljenosti PV+ ćelija. Na slici 5. predstavljeno je reprezentativno imunohistohemijско bojenje PV+ ćelija u korteksu i hipokampusu kontrolne grupe. Statistička analiza rezultata zastupljenosti PV+ ćelija obostrano u korteksu i hipokampusu na po 6 vidnih polja na uveličanju 200x prikazana je grafički. Analizom rezultata detektovana je redukcija broja PV+ ćelija u korteksu u grupama u kojima je reperfuzija trajala jedan ili sedam dana, ali bez statističke značajnosti. U hipokampusu ova redukcija primećena u I/R 1d i I/R 7d grupi je bila statistički značajna (Grafik 24).

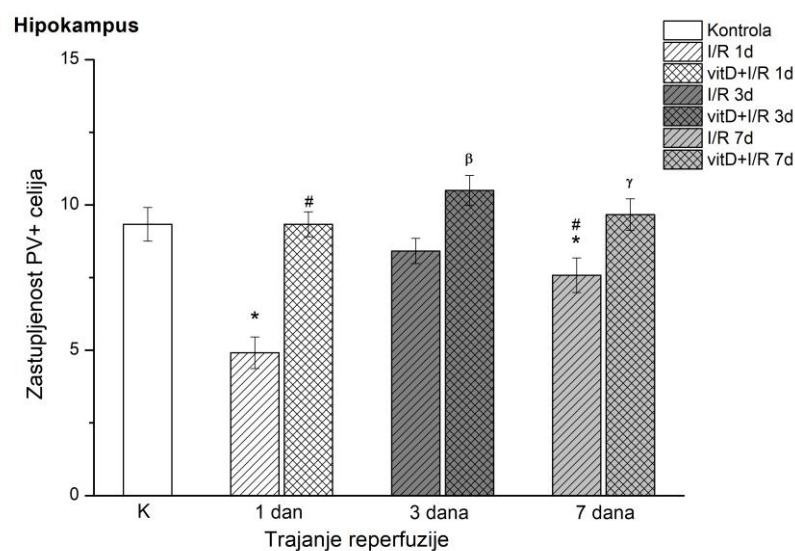
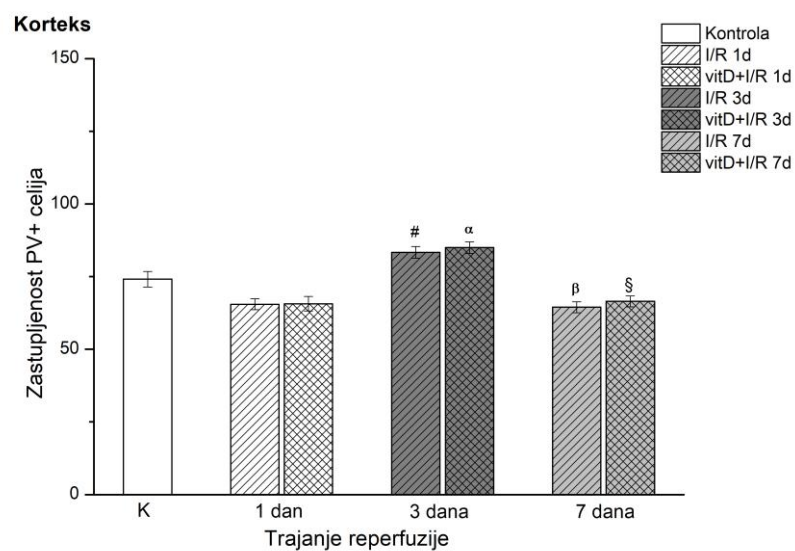


Grafik 23. Ekspresija PV proteina u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

- * $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.
- α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.
- β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.
- γ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 7d grupe.
- # $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.
- δ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 3d grupe.



Slika 5. Reprezentativni prikaz imunohistohemijskog bojenja PV+ ćelija u korteksu (A) i hipokampusu (B) džerbila kontrolne grupe na uveličanju 200x.



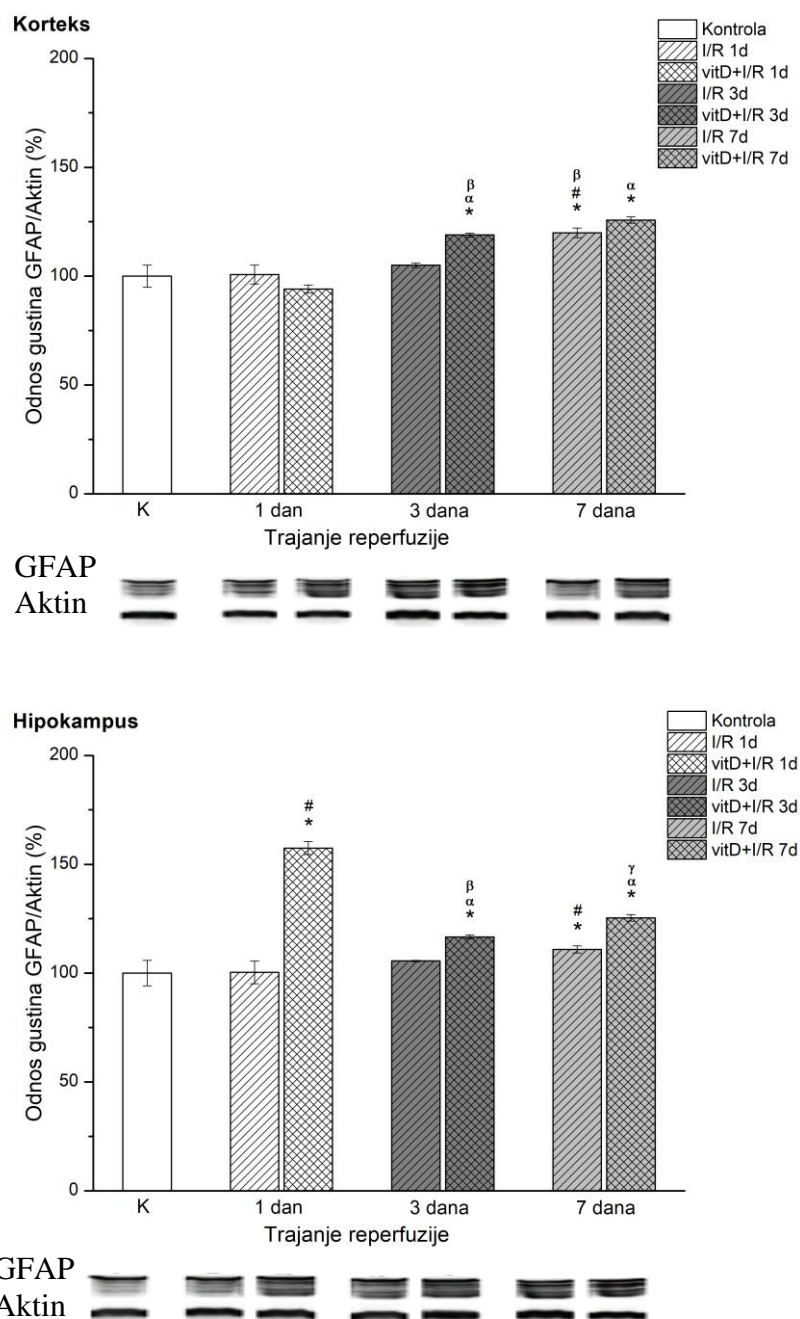
Grafik 24. Uticaj pretretmana vitaminom D i prolazne globalne ishemije i reperfuzije na zastupljenost PV+ ćelija u korteksu i hipokampusu džerbila. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

- * $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.
- # $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.
- β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.
- γ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 7d grupe.
- α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.
- \S $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 3d grupe.

4.3.3 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ekspresiju glijalnog kiselog fibrilarnog proteina (GFAP) i broj GFAP+ ćelija u korteksu i hipokampusu džerbila

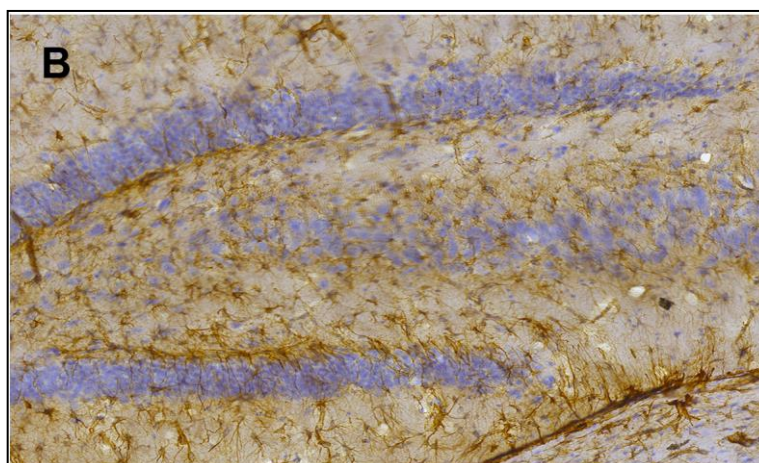
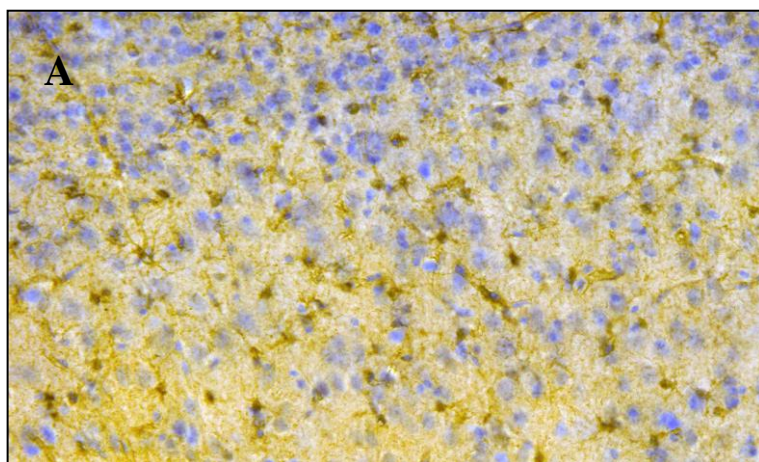
Upotrebom ANOVA testa pokazana je razlika među ispitivanim grupama u ekspresiji GFAP proteina u korteksu ($F_{6,34}=17,22$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,34}=31,18$; $p<0.05$) (Grafik 25). U korteksu statistički značajno povećanje ekspresije u odnosu na kontrolnu grupu prisutno je u I/R 7d, vitD+I/R 3d i vitD+I/R 7d. Statistički značajna razlika prisutna je i između I/R 3d i vitD+I/R 3d grupe. U hipokampusu statistički značajno povećanje ekspresije prisutno je u svim vitamin D pretretiranim grupama u odnosu na kontrolnu grupu i odgovarajuće I/R grupe.

Imunohistohemijskim bojenjem smo pratili zastupljenost astrocita u mozgu džerbila, određivanjem zastupljenosti GFAP+ ćelija. Na slici 5. predstavljeno je reprezentativno imunohistohemijsko bojenje GFAP+ ćelija u korteksu i hipokampusu kontrolne grupe. Statistička analiza rezultata zastupljenosti GFAP+ ćelija obostrano u korteksu i hipokampusu na po šest vidnih polja na uveličanju 200x prikazana je grafički. Analizom rezultata detektovan je veći broj GFAP+ ćelija u korteksu u vitD+I/R 3d, I/R 7d i vitD+I/R 7d grupi, a u hipokampusu u svim grupama koje su pretretirane vitaminom D i I/R 7d grupi u poređenju sa kontrolom (Grafik 26). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima proteinske ekspresije dobijene Western blot analizom.

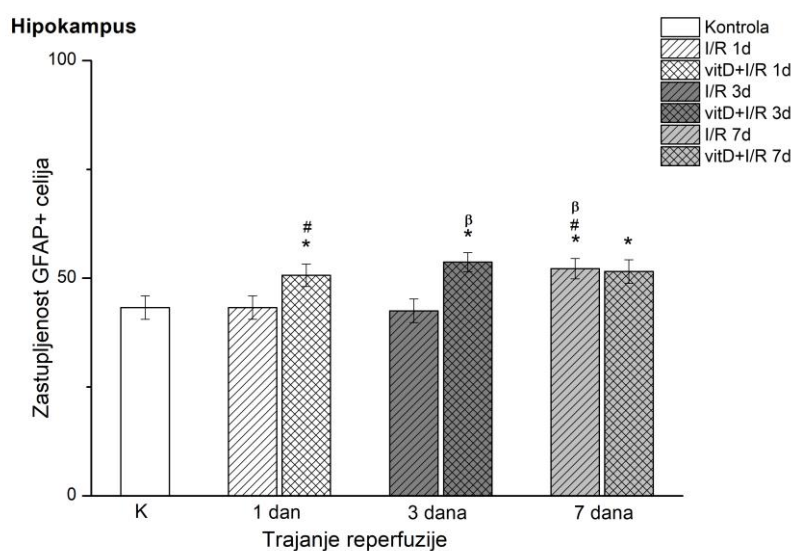
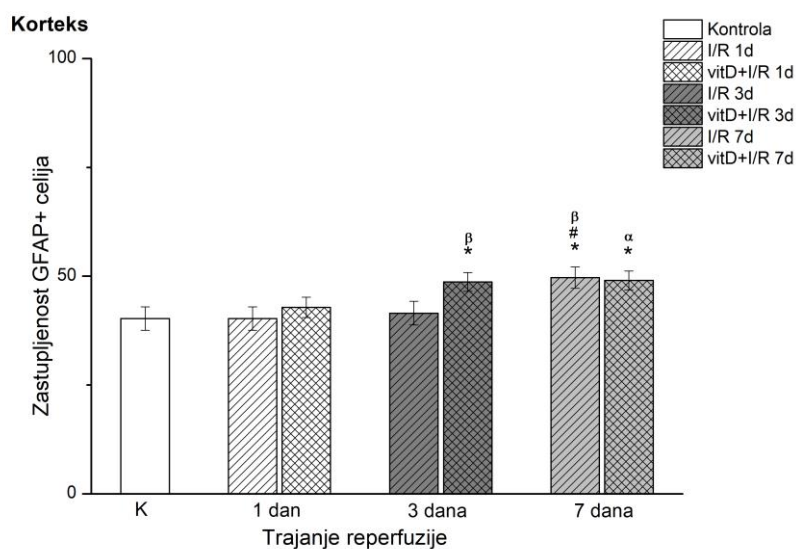


Grafik 25. Ekspresija GFAP proteina u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

- * $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.
- α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.
- β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.
- γ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 7d grupe.
- # $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.



Slika 6. Reprezentativni prikaz imunohistohemijskog bojenja GFAP+ ćelija u korteksu (A) i hipokampusu (B) džerbila kontrolne grupe na uveličanju 200x.



Grafik 26. Uticaj pretretmana vitaminom D i prolazne globalne ishemije i reperfuzije na zastupljenost GFAP+ ćelija u korteksu i hipokampusu džerbila. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.

α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.

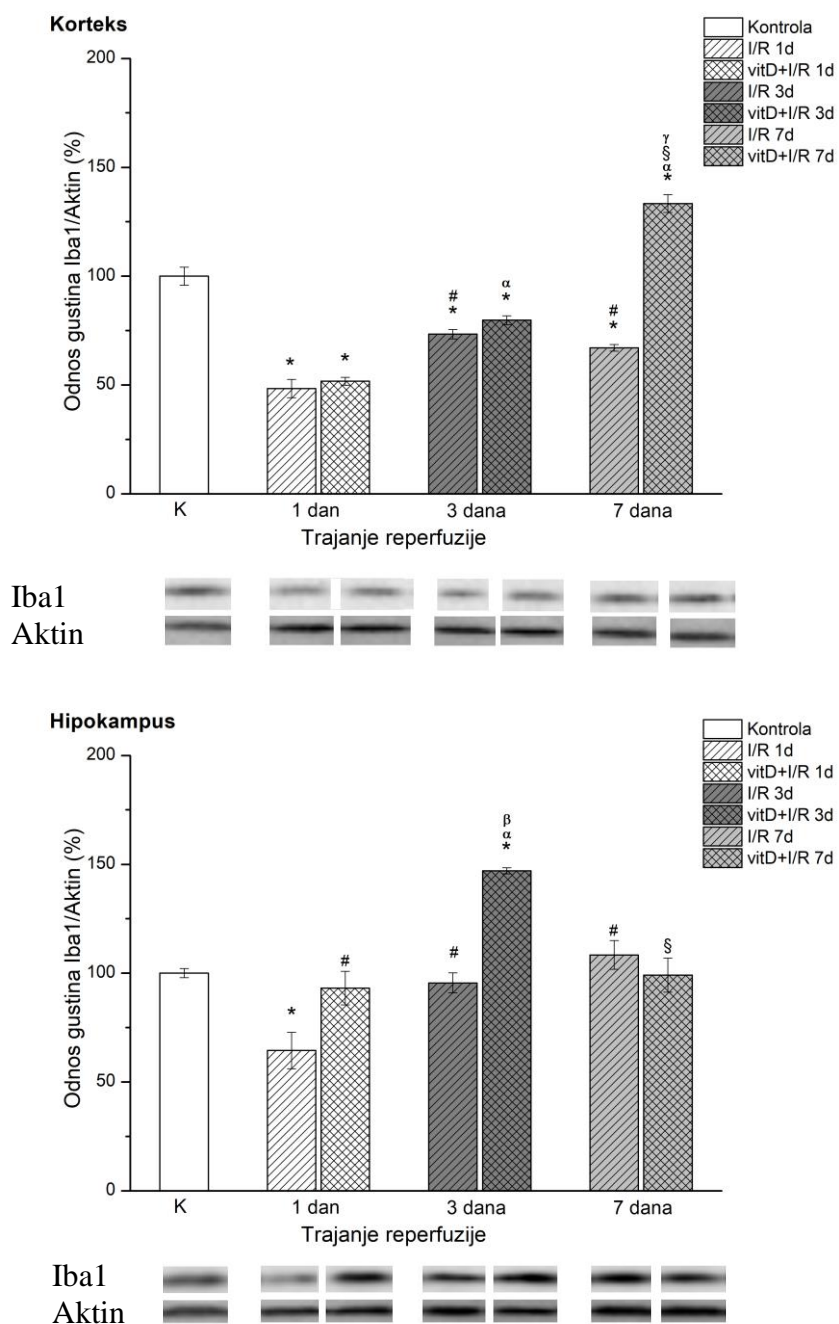
β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 3d grupe.

$p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.

4.3.4 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ekspresiju jonizovanog kalcijum-vezujućeg adapterskog proteina (Iba 1) i broj Iba+ ćelija u korteksu i hipokampusu džerbila

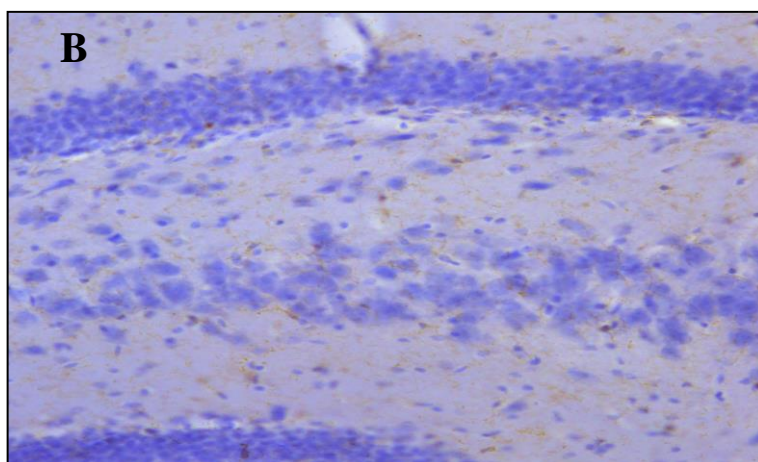
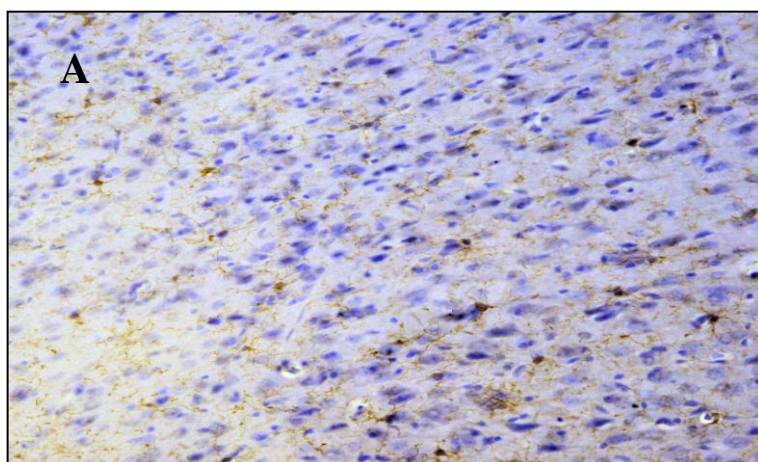
Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u ekspresiji Iba1 proteina u korteksu ($F_{6,34}=103,76$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,34}=19,21$; $p<0.05$) (Grafik 27). U korteksu statistički značajno sniženje ekspresije Iba1 proteina u odnosu na kontrolnu grupu prisutno je svim eksperimentalnim grupama, osim u vitD+I/R 7d u kojoj je ekspresija značajno viša u odnosu na kontrolnu i I/R 7d grupu. U hipokampusu u I/R 1d grupi postoji statistički značajno sniženje u odnosu na kontrolnu i vitD+I/R 1d. Statistički značajno povećanje ekspresije prisutno je u vitD+I/R 3d grupi u odnosu na kontrolnu i I/R 3d grupu.

Imunohistohemijskim bojenjem smo pratili zastupljenost mikroglije u mozgu džerbila, određivanjem zastupljenosti Iba1+ ćelija. Na slici 7. predstavljeno je reprezentativno imunohistohemijsko bojenje Iba1+ ćelija u korteksu i hipokampusu kontrolne grupe. Statistička analiza rezultata zastupljenosti Iba1+ ćelija obostrano u korteksu i hipokampusu na po šest vidnih polja na uveličanju 200x prikazana je grafički. Analizom rezultata detektovana je redukcija broja Iba1+ ćelija u korteksu nakon 3. dana reperfuzije u svim grupama osim u vitD+I/R 7d grupi gde je primećen veći broj ćelija u poređenju sa kontrolom (Grafik 28). U hipokampusu broj Iba1+ ćelija u vitD+I/R3d je ćelija nešto veći od kontrolne grupe. Međutim, u trećem i sedmom danu reperfuzije u I/R grupama obe ispitivane strukture, bez obzira na smanjen broj Iba1+ ćelija u korteksu, primećeno je da je došlo do promene morfologije ovih ćelija. U ovim grupama ćelije su ameboidne i manje razgranate što upućuje na to da je došlo do aktivacije (Slika 8A i 8B). U vitamin D pretretiranim grupama su ove promene takođe primećene, ali u manjem obimu.

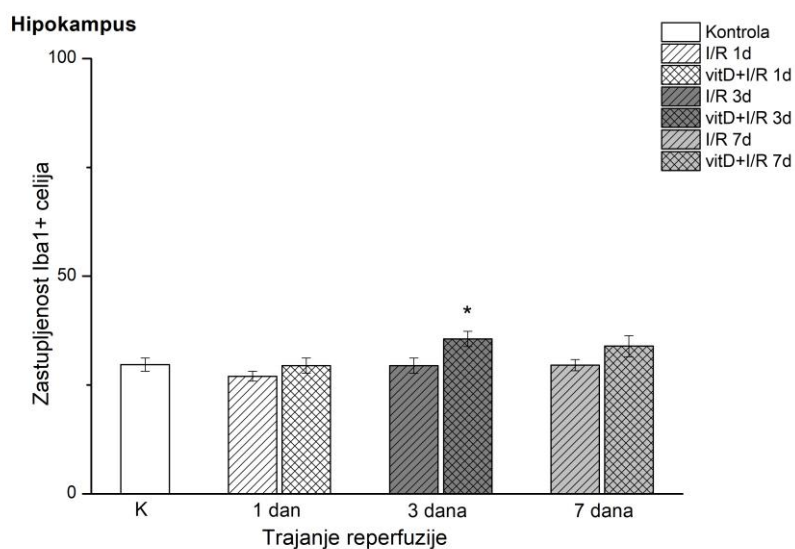
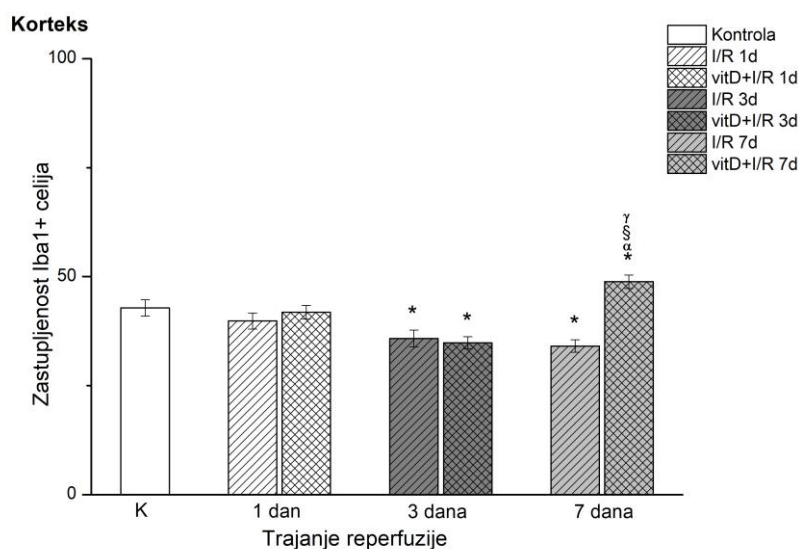


Grafik 27. Ekspresija Iba 1 proteina u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama životinja. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

- * $p < 0.05$ u odnosu na vrednost kontrolne grupe.
- # $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 1d grupe.
- γ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost I/R 7d grupe.
- α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 1d grupe.
- δ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost vitD+I/R 3d grupe.



Slika 7. Reprezentativni prikaz imunohistohemijskog bojenja Iba1+ ćelija u korteksu (A) i hipokampusu (B) džerbila kontrolne grupe na uveličanju 200x.



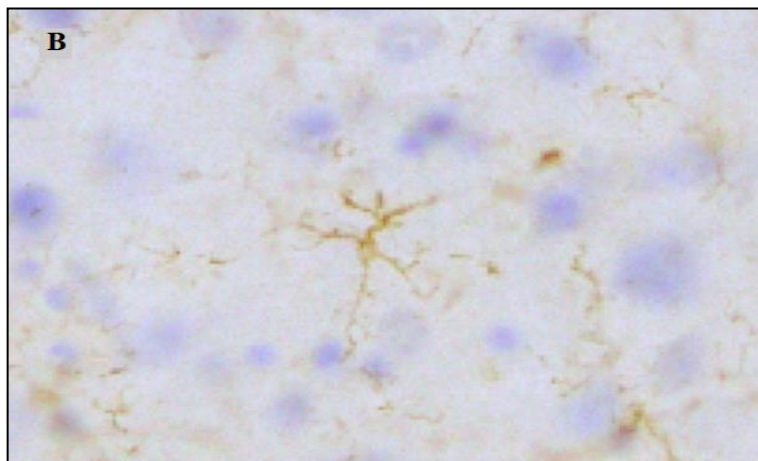
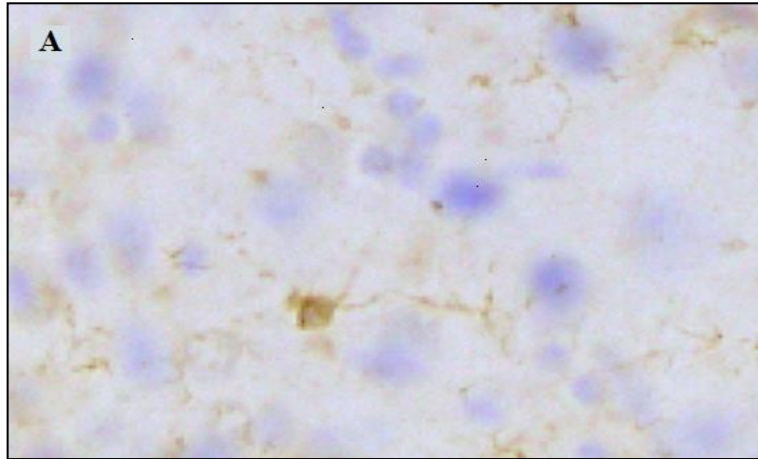
Grafik 28. Uticaj pretretmana vitaminom D i prolazne globalne ishemiije i reperfuzije na zastupljenost Iba1+ ćelija u korteksu i hipokampusu džerbila. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi kontrolne grupe.

γ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi I/R 7d grupe.

α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi vitD+I/R 1d grupe.

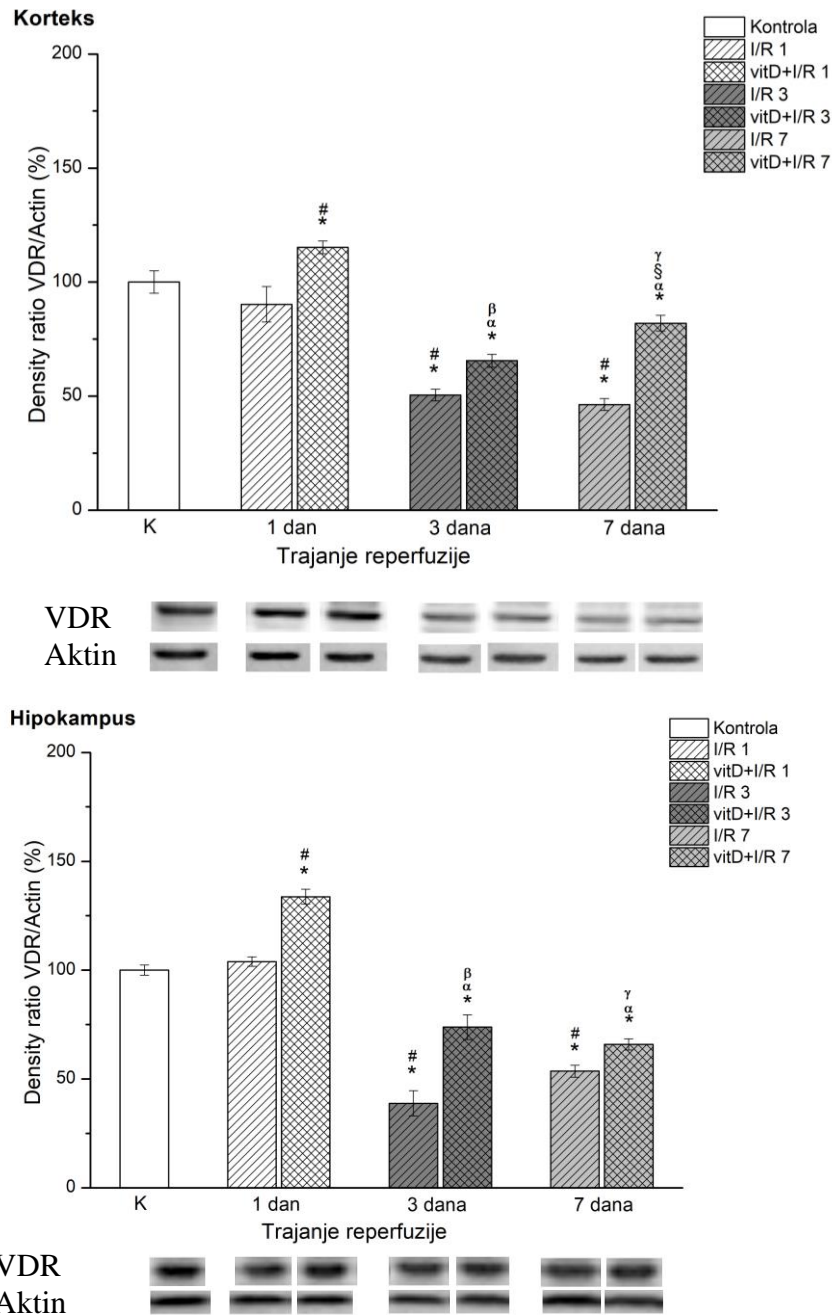
ξ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi vitD+I/R 3d grupe.



Slika 8 Reprezentativni prikaz imunohistohemijskog bojenja Iba1+ ćelija ameboidne morfologije (A); Prikaz ćelije razgranate morfologije u stanju mirovanja (B).

4.4 Ispitivanje uticaja pretretmana vitaminom D u uslovima prolazne globalne ishemije i reperfuzije mozga na ekspresiju VDR

Upotrebom ANOVA testa otkrivena je razlika među ispitivanim grupama u ekspresiji VDR proteina u korteksu ($F_{6,34}=46,66$; $p<0.05$) i hipokampusu ($F_{6,34}=127,35$; $p<0.05$) (Grafik 29). U korteksu i hipokampusu džerbila nakon jednog dana reperfuzije u vitD grupi ekspresija VDR je statistički značajno povišena u odnosu na kontrolnu i I/R 1d grupu. U trećem i sedmom danu reperfuzije dolazi do pada vrednosti ekspresije u svim grupama u odnosu na kontrolnu, s tim da je ekspresija značajno veća u vitD pretretiranim grupama u odnosu na odgovarajuće I/R grupe.



Grafik 29. Uticaj pretretmana vitaminom D i prolazne globalne ishemije i reperfuzije na ekspresiju VDR u korteksu i hipokampusu džerbila. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

- * $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi kontrolne grupe.
- α $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi I/R 1d grupe.
- β $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi I/R 3d grupe.
- γ $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi I/R 7d grupe.
- # $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi vitD+I/R 1d grupe.
- § $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi vitD+I/R 3d grupe.

5. DISKUSIJA

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da desetominutna prolazna globalna ishemija mozga nakon jednog, tri i sedam dana reperfuzije dovodi do oksidativnog stresa, promene u ekspresiji NOX2 i NOX4 i intenziviranja procesa apoptoze i autofagije. Što je još važnije, ova studija je pokazala da suplementacija vitaminom D pre I/R smanjuje oksidativni stres. S druge strane, pretretman vitaminom D je različito uticao na NOX2 i NOX4 u zavisnosti od moždane strukture i dužine trajanja reperfuzije. Međutim, ovom studijom nije primećen uticaj vitamina D na promene ispitivanih proteina apoptoze i autofagije izazivane ishemijom i reperfuzijom, osim uticaja na ekspresiju beklina 1 koja je bila povećana u hipokampusu životinja pretretiranih vitaminom D posle jednog i tri dana reperfuzije. Vitamin D je odložio umiranje neurona i sprečio umiranje PV+ ćelija u hipokampusu. Tretman vitaminom D je u uslovima prolazne globalne ishemije mozga i reperfuzije pokazao protektivan uticaj na preživljavanje astrocita koji su značajni za oporavak i regeneraciju tkiva. Takođe, nakon sedam dana reperfuzije je kod životinja pretretiranih vitaminom D zapažena povećana ekspresiju markera mikroglije koja ima protektivano dejstvo nakon ishemijske povrede mozga. Povećana ekspresija VDR nakon prvog dana reperfuzije kod životinja pretretiranih vitaminom D i podvrgnutih I/R ukazuje na to da suplementacija ima smisla bez obzira na početni nivo vitamina D.

Cerebralna ishemija uzrokuje kaskadu događaja koji dovode do ćelijskih promena. Ove promene uključuju smanjenje koncentracije ATP-a, oslobađanje kalcijuma iz intracelularnih skladišta, gubitak jonske homeostaze, ekscitotoksičnost, oslobađanje i metabolisanje arahidonske kiseline, mitohondrijalnu disfunkciju, aktivaciju različitih enzima uključujući proteaze, protein kinaze, azot oksid sintaze, endonukleaze i druge (Macdonald i Stoodley, 1998; Lee i sar., 1999). Mnogi od ovih događaja povezani su sa povećanom produkcijom slobodnih radikala kako tokom ishemije tako i u vreme uspostavljanja reperfuzije. Uloga oksidativnog stresa poprima mnogo veći udeo u patofiziologiji ishemijskog oštećenja jednom kada je cerebralni krvotok ponovo uspostavljen. Ovo se događa iz razloga što u prethodno kiseonikom depriviranom tkivu nagli porast njegovog nivoa prouzrokuje masivnu produkciju slobodnih radikala (Chan, 1996). Smatra se da je oksidativni stres jedan od najvažniji faktora koji dovodi do

pogoršanja oštećenja mozga u toku reperfuzije koja je, sa druge strane, neophodna radi spašavanja ishemijskom kompromitovanog tkiva. Uloga oksidativnog stresa u patofiziologiji promena koje pokreću ishemijska i reperfuzijska potvrđena je velikim brojem istraživanja (Cao i sar., 1988; Kitagawa i sar., 1990; Facchinetti i sar., 1998). Moždano tkivo je posebno osetljivo na oksidativnu povredu zbog visokog nivoa metaboličke aktivnosti, intenzivne produkcije reaktivnih kiseoničnih metabolita, velike količine polinezasićenih masnih kiselina, nižeg antioksidativnog kapaciteta i ograničenih mehanizama popravke (Evans, 1993). NADPH oksidaze (NOX) su jedan od glavnih izvor ROS i posebno je značajna činjenica da je ovo jedina enzimska familija čija je osnovna uloga da produkuju slobodne radikale (Casas i sar., 2015).

Ishemijska moždana izazvana podvezivanjem obe zajedničke karotidne arterije kod džebila predstavlja animalni model prolazne globalne moždane ishemijske koji imitira ishemijske povrede mozga nakon smanjenja cerebralnog protoka i naknadne reperfuzije, najčešće uzrokovane srčanim zastojem kod ljudi (Bacigaluppi, 2010; Yan i sar., 2015; Small, 2000).

Kardiovaskularne i cerebrovaskularne bolesti danas predstavljaju vodeće uzroke morbiditeta i mortaliteta na globalnom nivou, kao i uzroke socijalnog i ekonomskog opterećenja (The Atlas of Heart Disease and Stroke; SZO, 2009). Veliki broj studija je doveo u vezu nizak serumski nivo vitamina D sa rizikom od oboljevanja od kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti (Kestenbaum i sar., 2011; Kilkkinen i sar., 2009; Dobnig i sar., 2008), te se danas smatra da pandemija hipovitaminoze D doprinosi njihovoj povećanoj prevalenci u svetu (Zhang i Naughton, 2010; Pilz i sar., 2011; Scragg i sar., 2017). Epidemiološkim studijama je potvrđeno da skoro 50% svetske populacije pati od deficita vitamina D (Hu i sar., 2013; Razzaque i sar., 2006; Saito i sar., 2000).

Vitamin D reguliše široki spektar fizioloških i patoloških procesa u ćelijama krvnih sudova uključujući rast, migraciju i diferencijaciju, uticaj na imuni sistem, ekspresiju citokina, inflamatorni odgovor i drugo. U CNS-u se pokazalo da ovaj vitamin ostvaruje neuroprotektivno, imunomodulatorno i antiinflamatorno dejstvo (Zhang i sar., 2010; Wang i sar., 2001; Fu i sar., 2013). Finalni korak aktivacije vitamina D, odnosno

hidroksilacija pod uticajem 1- α -hidroksilaze (CYP27B) se može odigrati na lokalnom nivou, tj. unutar CNS-a u neuronima (Lugg i sar., 2015). Aktivna forma vitamina D se vezuje za svoj receptor, VDR koji je lokalizovan u brojnim ćelijama u organizmu, dok se u CNS-u nalazi u ćelijama endotela, astrocitima i neuronima (Provvedini i sar., 1983; Merke i sar., 1989; Langub i sar., 2001; Lee i sar., 2008). Vitamin D se našao u fokusu istraživanja bolesti CNS-a, a pokazano je da suplementacija može biti korisna u slučaju povećanog rizika za pojavu moždane ishemije kod ljudi (Pilz i sar., 2011; Scragg i sar., 2017). Deficijencija aktivne forme vitamina D povezana je sa pogoršanjem povrede nakon izazivanja fokalnog infarkta mozga kod pacova (Balden i sar., 2012).

5.1. Pretretman vitaminom D i oksidativni stres u uslovima prolazne globalne ishemije mozga

Rezultati nekliko studija su pokazali da enzimska familija NADPH oksidaza predstavlja značajan izvor reaktivnih kiseoničnih radikala nakon I/R. U CNS-u najzastupljenije izoforme su NOX2 i NOX4 (Ma i sar., 2017; Kahles i sar., 2007; Walder i sar., 1997; Chen i sar., 2009). Radermacher i sar. (2012) navode da su ove dve izoforme ushodno regulisane u prva 24 časa od nastupanja fokalne ishemije, kao i da je NOX2 povišen u ćelijama mikroglije, dok se NOX4 ekspirira u endotelnim ćelijama i neuronima. Kao potvrda da ovi enzimi značajno doprinose oštećenju nakon izlaganja I/R svedoče istraživanja kojima je pokazano da kod gp91^{phox} *knock-out* miševa izloženih prolaznoj fokalnoj ishemiji mozga dolazi do razvoja znatno manjih infarkta nakon tri dana reperfuzije u odnosu na divlji soj (Chen i sar., 2009; Chen i sar., 2011). Takođe, u istraživanjima sprovedenim na miševima koji nemaju funkcionalan gp91^{phox}, a koji su izlagani dvočasovnoj okluziji srednje cerebralne arterije i reperfuziji u trajanju od 22 sata, uočeno je smanjenje volumena infarkta, izostanak ranog oštećenja krvno-moždane barijere i usporen razvoj postishemijske zapaljenske reakcije (Kahles i sar., 2013).

U našoj studiji, džerbili podvrgnuti I/R imali su povećanu ekspresiju membranskih subjedinića NOX2 (gp91^{phox} i p22^{phox}) u obe ispitivane strukture mozga nakon jednog dana reperfuzije dok je u daljem toku reperfuzije došlo do strukturno specifičnih promena. Ekspresija gp91^{phox} u korteksu je nastavila da raste do trećeg dana reperfuzije, dok je u sedmom danu uočen značajan pad u odnosu na treći dan pri čemu nije

postignuta ekspresija kontrolne grupe. U hipokampusu u trećem danu reperfuzije prisutno je sniženje ekspresije ovog parametra u odnosu na kontrolu i prvi dan reperfuzije da bi u sedmom danu ona ponovo bila značajno viša od kontrole. Ovi rezultati potvrđuju značajnost gp91^{phox} kao izvora slobodnih radikala nakon I/R povrede. Zanimljivo je da je duže trajanje reperfuzije bilo povezano sa nižom ekspresijom p22^{phox} subjediniče u obe strukture. Promene ekspresije organizatorske i aktivirajuće citosolne sujediniče (p47^{phox} i p67^{phox}) su bile različite u ispitivanim strukturama mozga. U korteksu, ekspresija p47^{phox} je snižena od prvog do sedmog dana reperfuzije, dok je u hipokampusu ovo sniženje ekspresije bilo prisutno tek nakon tri dana reperfuzije. Sa druge strane aktivirajuća p67^{phox} je u korteksu statistički značajno snižena nakon trećeg dana reperfuzije, dok je u hipokampusu promena ekspresije prisutna samo nakon sedam dana reperfuzije i to u smislu povećanja. Ove promene subjediniče NADPH oksidaze ukazuju da na desetominutnu prolaznu globalnu ishemiju mozga najviše reaguje gp91^{phox}, dok se na osnovu ekspresije drugih subjediniča, pogotovo citosolnih stiče utisak pokušaja uspostavljanja ravnoteže.

Postoji značajan broj studija u kojima su ispitivane aktivnost i ekspresija pojedinih subjediniča NADPH oksidaze u različitim oboljenjima CNS-a (Bedard i Krause, 2007). Međutim, u studijama vezanim za ishemiju moždanog tkiva postoje velike razlike u odnosu na dužinu trajanja ishemije i reperfuzije kao i tip subjediniča NADPH oksidaze koje su određivane. U najvećem broju radova interval u kom dolazi do ushodne regulacije NOX sujediniča je između jednog i 24 časa od ishemije. S druge strane, u malom broju radova je ispitivana ekspresija više NOX sujediniča u različitim vremenskim intervalima. U ovim studijama je takođe pokazan različit obrazac eksprimiranja membranskih i citosolnih subjediniča nakon ishemije i reperfuzije. Naime, Yoshioka i sar. (2011) su pokazali da u strijatumu C57BL/6J miševa nakon 22-minutne prolazne globalne moždane ishemije i reperfuzije u trajanju od 3 sata do 7 dana dolazi do povećanja ekspresije gp91^{phox} u dva intervala i to 24 i 72 sata nakon ishemije. Ekspresija p47^{phox} i p67^{phox} je takođe pokazala bifazne promenene. Povećanje ekspresije ove dve subjediniče je viđeno rano, 3 i 6 sati nakon ishemije, i kasno, odnosno 72 sata nakon ishemijske povrede. Autori su sugerisali da je aktivacija NOX nastala u medijalnim „spiny“ neuronima strijatuma i endotelijalnim ćelijama u ranoj fazi i u reaktivnoj mikrogliji u kasnoj fazi (Yoshioka i sar., 2011). Kusaka i sar. (2004) su pored

postojanja vremenske dinamike u promjenama ekspresije pojedinih subjedinica NOX pokazali i da njihova ekspresija može varirati u odnosu na ćelijski kompartman. Ushodna regulacija NOX subjedinica nakon ishemije pokazana je i u drugim studijama (Chen i sar., 2009; Hong i sar., 2006; Kim i sar., 2009; Kusaka i sar., 2004; Liu i sar., 2008). Rezultati studije u kojoj je ispitivan uticaj prolazne fokalne ishemije u trajanju od 2 sata i reperfuzije u trajanju od 0-24 sata, na ekspresiju NOX subjedinica, su pokazali porast ekspresije gp91^{phox} i p47^{phox} u zoni penumbre. Takođe, u ovom istraživanju je potvrđena translokacija citosolne p47^{phox} subjedinice na membranu u toku drugog sata reperfuzije, nakon čega je zapaženo dalje povećanje ekspresije ovog proteina uz povećanje nivoa O₂⁻ (Hong i sar., 2006). Mogući uzroci registrovanja različitih promena ekspresije pojedinih NOX subjedinica između pojedinih studija su razlika u dizajnu eksperimenta, upotreba različite vrste životinja, kao i ispitivanje različitih struktura mozga.

Pored NOX2, i NOX4 je opisan kao značajan izvor slobodnih radikala u prolaznoj i permanentnoj fokalnoj ishemiji mozga (Radermacher i sar., 2013; Kleinschnitz i sar., 2010; Nishimura i sar., 2016). Naši rezultati pokazuju da je ekspresija NOX4 povećana u korteksu u trećem danu reperfuzije, dok je u hipokampusu smanjena nakon prvog i trećeg dana reperfuzije, da bi se u sedmom danu vratila na kontrolni nivo. Ovakav nalaz ukazuje da NOX4 nije važan izvor slobodnih radikala u hipokampusu u prolaznoj globalnoj ishemiji mozga, dok u korteksu može biti značajan u trećem danu reperfuzije. Nishimura i sar. (2016) su pokazali da je izlaganje ćelijske kulture pericita hipoksiji (1% O₂) tokom 24 časa praćeno ushodnom regulacijom iRNK za NOX4, kao i brzom nishodnom regulacijom ekspresije ovog molekula po reoksigenaciji i vraćanjem na kontrolni nivo nakon 24 sata u uslovima normoksije. U ovom istraživanju je takođe pokazan uticaj permanentne i prolazne fokalne ishemije na ekspresiju iRNK za NOX4 kod miševa. U oba modela ishemije došlo je do povećanja ekspresije iRNK za NOX4 pogotovo u periinfarktnoj zoni, ali je ekspresija bila znatno slabija nakon prolazne fokalne ishemije. Koliko nam je poznato, do sada nema objavljenih radova u kojima je ispitivana ekspresija NOX4 u uslovima prolazne globalne ishemije mozga.

Porast nivoa pokazatelja oksidativnog stresa, O₂⁻ i MDA u našem istraživanju zapažen je paralelno sa porastom ekspresije NOX2, odnosno gp91^{phox}. Naime, koncentracija O₂⁻

je bila povećana u prva tri dana nakon izvođenja ishemije u obe ispitivane strukture da bi sedmog dana vrednost ovog parametra bila vraćena na kontrolni nivo. Marker lipidne peroksidacije, MDA, je takođe bio povišen u korteksu nakon izlaganja ishemiji i reperfuziji u trajanju od jedanog i tri dana, a u hipokampusu je koncentracija ovog parametra bila fazno promenjena i porast je uočen u prvom i sedmom danu reperfuzije, što odgovara profile ekspresije gp91^{phox}. Povećana lipidna peroksidacija može biti odgovorna za smrti neurona. Ona dovodi do narušavanja integriteta membrane, poremećaja funkcije transportnog lanca elektrona, poremećaja jonske homeostaze i posledično do povećanja osetljivosti nervnih ćelija na ekscitotoksičnost (Mattson, 1998; Springer i sar., 1997).

Nivo SH grupa u korteksu je bio snižen u prva tri dana reperfuzije, dok je u hipokampusu bio snižen tokom čitavog perioda reperfuzije što govori u prilog većoj osetljivosti ove strukture. Koncentracije GSH su u obe ispitivane strukture mozga bile snižene u prvom danu reperfuzije, nakon čega su vraćene na kontrolni nivo. Studija Candelario-Jalil i sar. (2001) na modelu prolazne petominutne globalne ishemije mozga džerbila i reperfuzije u trajanju od 3 sata do 7 dana je pokazala da posmatrajući oksidativne parametre kroz vremensku odrednicu, regioni korteksa i hipokampusa reaguju drugačije na proces ishemije. Utvrđeno je da u hipokampusu postoji kasni maksimalni pik oksidativnog oštećenja, koji je praćen poremećajem metabolizma glutaciona (Candelario-Jalil i sar., 2001). Sa druge strane u korteksu su primećeni rani pokazatelji oksidativnog stresa (visoki nivoi MDA nakon 12 i 24 časa reperfuzije), ali bez poremećaja u antioksidativnom kapacitetu. Glutacion ima vitalnu ulogu u mnogim ćelijskim procesima i bitno utiče na ćelijsku proliferaciju (Aw, 2003). GSH reaguje sa elektrolitima, fiziološkim metabolitima, ksenobioticima, učestvuje u metabolizmu prostangladina i uključen je u sistem glikozilacije proteina (Fang i sar., 2002). Glutacion je esencijalan za aktivaciju T limfocita i polimorfonuklearnih leukocita kao i za produkciju citokina (Townsend i sar., 2003). Zatim, GSH uklanja slobodne radikale i druge reaktivne oblike kiseonika (hidroksilni radikal, lipidne perokside, vodonik peroksid) i to direktno ili indirektno posredovano enzimski katalisanim reakcijama. Svoju antioksidativnu ulogu GSH ostvaruje tako što selen zavisni enzim glutacion peroksidaza redukuje H₂O₂ do vode, a sam GSH se tada oksiduje u GSSG. Redukcija oksidovanog glutaciona se dešava pomoću NADPH zavisne glutacion reduktaze (Lei,

2002). Važno je napomenuti da pomeranje odnosa GSH/GSSG u korist oksidovanog stanja utiče na aktivaciju nekoliko signalnih puteva (protein kinazu B, protein fosfataze, NF- κ B i druge) redukujući ćelijsku proliferaciju i pospešujući apoptozu (Sen, 2000). Redukcija glutationa povezana je sa brojnim patološkim stanjima uključujući i bolesti CNS-a. Naši rezultati upućuju da je u hipokampusu nakon desetominutne prolazne ishemije oksidativni stres prisutan duže u odnosu na korteks. Da je hipokampus zaista struktura koja je više pogođena nakon ishemije, ukazuju i nalazi snižene aktivnosti enzima γ GCL koji učestvuje u sintezi glutationa kao i GPx koji uklanja vodonik peroksid uz oksidovanje glutationa.

Aplikacija vitamina D sedam dana pre izvođenja ishemije uticala je na oksidativni status ispitivanih moždanih struktura. Naime, u grupama koje su pre ishemije dobile vitamin D, ekspresija gp91^{phox} je bila snižena u obe ispitavane strukture u odnosu na I/R u svim praćenim periodima reperfuzije. U korteksu je međutim nakon tri i sedam dana reperfuzije ekspresija bila i dalje veća nego u kontrolnoj grupi dok je u hipokampusu u svim periodima reperfuzije bila niža u odnosu na vrednost u kontroli. Dakle, hipokampus, koji se pokazao podložniji oksidativnom stresu, je pokazao veću osetljivost na tretman vitaminom D. Vitamin D je uticao strukturno specifično na ekspresiju p22^{phox}. U korteksu je primećeno da pretretman vitaminom D povećava ekspresiju ove subjediniće nakon prvog i sedmog dana reperfuzije u odnosu na odgovarajuće I/R grupe i kontrolu, dok u hipokampusu snižava ekspresiju ovog proteina ispod kontrolnih vrednosti u svim ispitivanim danima reperfuzije. Na ekspresiju organizatorske p47^{phox} subjediniće vitamin D utiče tako što održava ekspresiju na kontrolnom nivou u prva tri dana reperfuzije u korteksu, dok u hipokampusu u istom vremenskom opsegu dolazi do snižavanja ekspresije ispod kontrolnih i vrednosti u odgovarajućoj I/R grupi. U sedmom danu reperfuzije u obe strukture ekspresija ove subjediniće je viša u odnosu na vrednosti u I/R grupi. Vitamin D je doveo do porasta ekspresije p67^{phox} u prvom danu posle I/R, da bi se kasnije ekspresija ovog markera vratila na vrednost u kontroli u obe strukture.

Pretretman vitaminom D je uticao na smanjenje ekspresije NOX4 u korteksu koje je bilo zapaženo u trećem danu reperfuzije, dok je u hipokampusu u prvom danu reperfuzije vratio sniženu ekspresiju ovog proteina na nivo u kontrolnoj grupi, da bi

trećeg i sedmog dana doveo do smanjenja ekspresije ispod nivoa u kontroli. Zanimljivo je da su promene u ekspresiji NOX4 u korteksu bile najizraženije u trećem danu reperfuzije u kome se u tom trenutku zapažaju i promene ekspresije gp91^{phox}, kao promene ekspresije proteina apoptoze (AIF i kaspazu 3) i autofagije (beklin 1). Ovakav nalaz upućuje da je korteks najosetljiviji trećeg dana reperfuzije.

Rezultati drugih studija o uticaju vitamina D na ekspresiju subjedinica NADPH oksidaze govore u prilog protektivnih efekata ovog vitamina, u smislu smanjenja ekspresije NOX2 i NOX4. Studija Donga i sar. (2012) je pokazala da vitamin D ima efekat na smanjenje ekspresije NOX2, NOX4 i nivoa ROS u modelima renovaskularne hipertenzije kako *in vivo* tako i *in vitro*. Slično tome, Hirata i sar. (2013) pokazali su smanjenu ekspresiju p22^{phox} posle tretmana sa analogom 22-oksakalcitriola kalcitriola u životinjskom modelu dijabetesa mellitusa 2, kao i kod endotelnih ćelija humanih koronarnih arterija kultivisanih u visokoj glukoznoj sredini. Tretman kulture humanih promijelocitnih NB4 ćelija vitaminom D, takođe je doveo do smanjenja ekspresije subjedinica NOX2 (gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox} i p67^{phox}) (N'Diay i sar., 1997). Koliko je nama poznato, do sada nema radova u kojima je ispitivan uticaj vitamina D na ekspresiju proteina NOX2 i NOX4 u uslovima prolazne globalne ishemije mozga, dok se veći broj radova bavio praćenjem uticaja vitamina D na ekspresiju ovih proteina u uslovima prolazne fokalne ishemije mozga. Najnovija studija Evansa i sar. (2018) u kojoj je ispitivan efekat vitamina D (*i.p.*, 100ng/kg/dan) na pokazatelje oksidativnog stresa i inflamacije u mozgu miševa podvrgnutih fokalnoj prolaznoj ishemiji u trajanju od 60 minuta i 24 časa reperfuzije je pokazala da vitamin D smanjuje ekspresiju gp91^{phox} održavajući je na kontrolnom nivou. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatom naše studije. Mi smo takođe pokazali da vitamin D i u kasnijem toku reperfuzije održava ekspresiju ove membranske subjedinice značajno nižom od odgovarajućih I/R grupa, što je u skladu sa ekspresijom VDR-a. Naši rezultati takođe pokazuju različit efekat vitamina D na druge subjedinice NADPH oksidaze u zavisnosti od vremena reperfuzije i strukture mozga. Zanimljivo je da je vitamin D u korteksu uzrokovao recipročne promene gp91^{phox} i ostalih subjedinica (p22^{phox}, p47^{phox} i p67^{phox}). U hipokampusu je ekspresija pojedinih subjedinica NOX bila usklađnija posebno nakon trećeg dana reperfuzije.

Daljim ispitivanjem pokazatelja oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite ustanovili smo da je u grupama koje su pre I/R tretirane vitaminom D nivo O_2^- ostao na kontrolnim vrednostima, a aktivnost enzima SOD je bila značajno viša u poređenju sa odgovarajućom I/R grupom. Prethodne studije su pokazale da SOD predstavlja glavni endogeni zaštitni sistem protiv ekscitotoksične i ishemijske, odnosno hipoksične lezije (Chan, 2001). Pretretman vitaminom D doveo je do normalizacije nivoa MDA u odnosu na odgovarajuće I/R grupe tako da je koncentracija ovog pokazatelja oksidativnog stresa bila na nivou vrednosti u kontroli u obe strukture mozga. Takođe, u korteksu životinja pretretiranih vitaminom D nivo SH grupa je vraćen na vrednosti u kontroli u svim periodima reperfuzije, dok je u hipokampusu do normalizacije ovog parametra došlo tek u sedmom danu. U životinja pretretiranih vitaminom D aktivnost svih enzima metabolizma glutaciona je bila značajno veća u odnosu na odgovarajuće I/R grupe u obe ispitivane strukture mozga. Vitamin D je bio posebno delotvoran u očuvanju nivoa glutaciona u hipokampusu. U korteksu je, međutim, u prva tri dana reperfuzije izazvao još veći pad nivoa GSH u odnosu na odgovarajuće I/R grupe da bi sedmog dana došlo do statistički značajnog povećanja koncentracije ovog molekula i u odnosu na odgovarajuću I/R grupu i u odnosu na kontrolu. Dakle, najveće promene i ovog parametra su zapažene u trećem danu reperfuzije, što je u skladu sa nalazima promena ekspresije NOX2 i NOX4, kao i pokazatelja apoptoze i autofagije.

Rezultati ovog dela istraživanja govore u prilog antioksidativne uloge vitamina D. U rezultatima drugih studija takođe je pokazan antioksidativni kapacitet vitamina D. U studiji na animalnom modelu nealkoholne masne bolesti jetre (Zhu i sar., 2017) autori su primetili da intraperitonealno ubrizgavanje $1,25-(OH)_2D_3$, dvaput nedeljno, tokom 16 nedelja, ispoljava zaštitne efekte prema oksidativnom stresu u jetri. Pretpostavljeno je da se antioksidativni kapacitet vitamina D ostvaruje preko indukcije faktora translokacije nukleotida NRF2, te da povećava ekspresiju gena koji kodiraju antioksidativne enzime (Zhu i sar., 2017) i inhibiraju NF- κ B, NOX2 i NOX4 (Won i sar., 2015; Katsuyama i sar., 2012).

5.2 Vitamin D i procesi apoptoze i autofagije u uslovima prolazne globalne ishemije mozga

Programirana ćelijska smrt ima kritičnu ulogu za vreme razvoja i u održavanju ćelijske homeostaze. Apoptoza je energetski zahtevan proces ćelijske smrti koji uzrokuje karakteristične morfološke promene ćelije, kao što su smežuravanje ćelije, pupljenje membrane, kondenzacija hromatina i fragmentacija DNK (Kerr i sar., 1972). Međutim, poremećaj regulacije ovog procesa je dokumentovan u različitim bolestima: od tumora, preko autoimunskih bolesti do neurodegenerativnih oboljenja i ishemije (Nakka i sar., 2008). Pretpostavljeno je da signali koji utiču na ćelijsko preživljavanje ili smrt ćelija imaju značajnu ulogu u patogenezi kako fokalne tako i globalne cerebralne ishemije (Sugawara i sar., 2004). U eksperimentalnim animalnim modelima ishemijske povrede mozga dokazane su morfološke i biohemijske promene ćelija koje su karakteristične za proces apoptoze. Najubedljivije morfološke promene nakon izazivanja fokalnog ishemijskog oštećenja zabeležene su u fazi reperfuzije u zoni penumbre (Li i sar., 1995; Charriaut-Marlangue i sar., 1996; Fujimura i sar., 1998; Li i sar., 1997; Li i sar., 1998). Takođe, histološki i biohemijski markeri ovog procesa su prisutni u mozgovima životinja izloženih prolaznoj ishemiji (MacManus i sar., 1994; Kihara i sar., 1994; Nitatori i sar., 1995).

Proces apoptoze može biti pokrenut kaspaza zavsnim ili nezavisnim mehanizmima. Kaspaze predstavljaju glavne proteine uključene u proces autofagije i njihovu aktivaciju mogu uzrokovati spoljašnji signali ili razvoj mitohondrijalne disfunkcije. Unutrašnji i spoljašnji put razvoja apoptoze se sreću na nivou kaspaze 3, koja deluje kao egzekutor u ćeliji izazivajući proteolizu različitih ćelijskih proteina (Kroemner i sar., 2007; Whealan i sar., 2010). Sa druge strane, AIF može samostalno pokrenuti ovaj proces u različitim ćelijama i može imati ulogu u mnogobrojnim neurodegenerativnim bolestima, pa i modelima infarkta mozga, amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi, povredi kičmene moždine i Alchajmerovoj bolesti (Cregan i sar., 2002; Culmsee i sar., 2005; Wang i sar., 2009). U fiziološkim uslovima AIF je uronjen u unutrašnjost mitohondrija, ali u prisustvu stresora on se otpušta iz mitohondrija i translocira u jedro gde izaziva fragmentaciju jedra. Studija Yu i saradnika (2009) je ukazala na postojanje dve frakcije AIF unutar mitohondrija. Jedan pul AIF proteina je lokalizovan u intermembranskom prostoru mitohondrija, dok je drugi na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani. Upravo ovaj drugi pul je zaslužan za brzo otpuštanje AIF proteina sa mitohondrija i u citoplazmu i nukleus (Wang i sar., 2009). Pored toga, pokazano je da translokaciju AIF može pokrenuti i

aktivirana poliADP-ribozo polimeraza 1 (engl. *poly ADP riboso polymerase*, PARP-1) nakon signala smrti ćelije, mada je u drugim studijama potvrđeno da AIF može biti otpušten i PARP-1 nezavisnim mehanizmima. Generalno je prihvaćeno da oksidativni stres uzrokuje preteranu aktivaciju PARP-1 koji dalje uzrokuje otpuštanje AIF-a u citoplazmu i nukleus (Kondo i sar., 2010; Yu i sar., 2012).

Prema rezultatima našeg istraživanja statistički značajno povećanje ekspresije kaspaze 3, u korteksu u odnosu na kontrolnu grupu i na grupe kod kojih je reperfuzija trajala jedan dan, uočeno je nakon tri dana reperfuzije. U hipokampusu je, međutim u trećem danu reperfuzije zapažen pad u ekspresiji kaspaze 3 u odnosu na kontrolnu grupu što ukazuje da apoptoza nije proces kojim ćelije hipokampusa umiru u toj fazi. Pored toga, statistički značajno povećanje ekspresije AIF takođe se zapaža u trećem danu reperfuzije u korteksu, i sugeriše da do aktivacije procesa apoptoze dolazi i kaspaza nezavisnim mehanizmom. Uloga kaspaza nezavisnog mehanizma nakon I/R pokazana je i u drugim studijama (Li i sar., 1995; Nakka i sar., 2008). Povećanje ekspresije oba proteina odnosno kaspaze 3 i AIF-a, sugerišu nastanak disfunkcije mitohondrija. U našem istraživanju vitamin D nije uticao na kaspaza zavisani i nezavisni put apoptoze u korteksu, odnosno on nije sprečio porast ekspresije kaspaze 3 i AIF-a u korteksu džerbila 3 dana nakon ishemije. Upotrebom TEM-a potvrdili smo pojavu procesa apoptoze u ovim grupama. Međutim, moguće je da postoji razlika u putu aktivacije između vitaminom D tretiranih i netretiranih džerbila. Naime, Yao i saradnici (2015) su na modelu ishemije i reperfuzije miokarda pokazali da u uslovima I/R dolazi do aktivacije kaspaze 12 (kaspaza porekla iz endoplazmatskog retikuluma), kaspaze 9 (mitohondrijalna kaspaza) i kaspaze 8 (inicijatorska kaspaza spoljašnjeg puta aktivacije apoptoze), a da agonisti VDR receptora značajno redukuju oštećenje miokarda inhibicijom kaspaze 12 i kaspaze 9, ali da nemaju uticaja na kaspazu 8. Ovi naučnici su takođe potvrdili da administracija VDR agonista smanjuje oticanje mitohondrija i otpuštanje citohroma c (Yao i sar., 2015). Druga grupa naučnika je potvrdila da inhibicija kaspaze 9 nije dovoljna da zaštiti neurone od umiranja u procesu apoptoze već samo da dovodi do odlaganja ovog procesa (Cao i sar., 2010).

Zanimljivo je da je u trećem danu reperfuzije uz povećanje ekspresije kaspaze 3 i AIF u korteksu prisutno i povećanje ekspresije gp91^{phox} i NOX4 u poređenju sa kontrolom, a

brojna istraživanja su pokazala povezanost u ekspresiji ovh proteina (Kim i sar., 2012; Dai i sar., 2018; Hong i sar., 2017). Veza između ROS i apoptoze je detaljnije ispitana korišćenjem više različitih eksperimentalnih modela. Ovim radovima je sugerisano da ROS produkovani u reperfuziji imaju odlučujuću ulogu u programiranoj smrti neurona nakon izlaganja procesu ishemije (Kim i sar., 2012; Dai i sar., 2018; Hong i sar., 2017). Kao što smo već napomenuli, široko je prihvaćeno da je jedan od značajnih izvora ROS-a u ishemijom pogođenom tkivu enzimska familija NADPH oksidaza. Međutim, pored dobro proučenih proteinskih komponenti ovih enzima, Kim i saradnici (2009) su pokazali da i kazein kinaza 2 (*casein kinase 2* – CK2) igra ključnu ulogu i to kao negativni modulator produkcije ROS posredstvom gp91^{phox} nakon I/R. Ovi naučnici su su takođe pokazali da inhibicija ovog proteina uzrokuje povećanju aktivaciju PARP-1, što uključuje veću translokaciju AIF-a. Ovi efekti CK2 inhibicije nakon izlaganja I/R izostaju kod gp91^{phox} *knock-out* miševa (Kim i sar., 2012). Ovom studijom je takođe utvrđeno da farmakološka inhibicija CK2 dovodi do istih efekata, što potvrđuje činjenicu da su upravo ROS porekla NADPH oksidaze odgovorni za oštećenje mozga uzrokovano ishemijom. Pored ovog signalnog puta takođe je nađeno da su ROS porekla NOX2 i NOX4 aktivatori NF- κ B. Naime, ROS promovišu fosforilaciju i degradaciju inhibitora κ B (I κ B α) što dovodi do translokacije kompleksa NF- κ B u jedro gde moduliše ekspresiju kaspaze 3 indukujući apoptozu (Matsushita i sar., 2000; Hafeez i sar., 2008; Chen i sar., 2004; Lin i sar., 2004). Međutim, u našem istraživanju gp91^{phox} je ostao povišen i u sedmom danu reperfuzije kao i u svim I/R grupama u hipokampusu, a markeri apoptoze nisu odreagovali na to povišenje. Ovo ukazuje da je moguće da je u prolaznoj globalnoj ishemiji mozga za pojavu apoptoze u korteksu u trećem danu reperfuzije odgovoran NOX4.

Brojna istraživanja su pokazala da u animalnom modelu prolazne ishemije i reperfuzije mozga dolazi do porasta ekspresije AIF (Zhu i sar., 2003; Cao i sar., 2003). Takođe je utvrđeno da nivo AIF pozitivnih ćelija korelira sa stepenom zahvaćenosti moždanog parenhima procesom ishemije (Zhu i sar., 2003). U studiji fokalne prolazne ishemije mozga translokacija AIF-a je detektovana već nakon 8 časova od ishemijske povrede, dok je u uslovima globalne ishemije povećanje u ekspresiji AIF proteina uočeno 24 i 72 časa nakon ishemije (Zhu i sar., 2003; Cao i sar., 2003). U našem modelu prolazne globalne ishemije mozga džerbila u hipokampusu zapazili smo sniženje ekspresije AIF

proteina, dok je pretretman vitaminom D rezultirao nepromenjenom ekspresijom AIF u odnosu na kontrolu. Ovo sniženje ekspresije u uslovima ishemije i reperfuzije može biti povezano sa većim nivoom oksidativnog stresa, s obzirom na to da je pokazano da AIF može biti hvatač slobodnih radikala i da ima ulogu u održavanju mitohondrijalne homeostaze i energetskog metabolizma (Mustacich i Powis, 2000; Miramar i sar., 2001; Klein i sar., 2002;). Kako je vitamin D očuvao nivoe AIF-a u hipokampusu u okviru vrednosti u kontroli, možemo pretpostaviti da je regulišući nivo AIF proteina delovao protektivno u smislu sprečavanja porasta nivoa slobodnih radikala.

Nekoliko ranijih studija je pokazalo da je proces autofagije indukovano u uslovima cerebralne ishemije u nekoliko različitih animalnih modela uključujući i fokalnu i globalnu moždanu ishemiju, kao i u modelima hipoksije-ishemije i kod miševa i kod pacova (Rami i sar., 2008; Wen i sar., 2008; Tian i sar., 2010; Koike i sar., 2008; Carloni i sar., 2008; Wang i sar., 2011). Pored toga, pokazano je da inhibicijom ovog visoko evolutivno konzerviranog procesa umiranje piramidnih neurona u hipokampusu nakon I/R može biti sprečeno, što ga čini potencijalnom terapijskom metodom (Koike i sar., 2008). Međutim, uloga autofagije u eksperimentalnoj ishemiji nije do kraja razjašnjena. Naime, aktivacijom procesa autofagije održava se ćelijska homeostaza i omogućava se ćelijsko preživljavanje i to čišćenjem ćelije od disfunkcionalnih organela, toksičnih metabolita, intracelularnih patogena ili čak učestvovanjem u izgradnji gradivnih blokova koji su neophodni za očuvanje vitalnih funkcija tokom nutritivne deprivacije (Mizushima, 2007; Shintani i Klionsky, 2004). Međutim, autofagija može biti okidač za pokretanje neapoptotske programirane smrti ćelija kroz ekscesivan proces autodigestije i degradacije esencijalnih ćelijskih komponenti (Shintani i Klionsky, 2004; Uchiyama i sar., 2008). Tokom autofagije ćelija se čisti od ostarelih proteina i ćelijskih komponenti putem lizosomalne degradacije (Mizushima, 2007; Yorimitsu i sar., 2006; Sarkar i sar., 2007). U toku autofagije citoplazmatske komponente se sekvstriraju u vezikule sa dvostrukom membranom koje se nazivaju autofagozimi i koje se onda fuzionišu sa lizozomom formirajući jednomembranski autofagolizozom u kom se sekvstrirane ćelijske komponente razgrađuju pod uticajem lizosomalnih hidrolaza. Proteini značajni za formiranje autofagozoma su beclin 1 i LC3. Beclin 1 je ključan za regrutaciju drugih proteina koji učestvuju u autofagiji, i to pre formiranja autofagozomne membrane (Liang i sar.,

1999; Pattingre i sar., 2005). Sa druge strane LC3 se može naći u citosolnoj formi kao LC3-I i u formi LC3-II kada je vezan za membranu. Odnos prevođenja LC3-I u LC3-II je direktno povezan sa obimom formiranja autofagozoma (Kabeya i sar., 2000). Još jedan protein čiji je nivo u obrnutoj vezi sa procesom autofagije je p62. Ovaj protein se povezuje direktno sa LC3 i na taj način se inkorporira u autofagozom, a na kraju se u procesu autofagije i razgradi (Bjorkoy i sar., 2006).

U eksperimentanoj studiji na miševima u modelu fokalne cerebralne ishemije praćena je promena u ekspresiji prethodno opisanih markera, beklina 1, LC3-II i p62 u zoni ishemične penumbre (Yang i sar., 2015; Deng i sar., 2016). Već nakon jednog sata od ishemije utvrđeno je povećanje ekspresije beklina 1 i LC3-II, sa tendencijom povećanja ekspresije nakon 6 časova, dok je najveća ekspresija zabeležena nakon 24 i 48 časova. Na suprot tome, ekspresija p62 je bila značajno snižena tokom čitavog vremena praćenja, s tim što su najniži nivoi ekspresije zabeleženi 24 časa nakon ishemije. Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodnim studijama kojima je pokazano da ishemija pokreće proces autofagije (Rami i sar., 2008; Gao i sar., 2012). Međutim osim što su analizom ekspresije navedenih proteina utvrdili autofagiju, ovi autori su imunohistohemijski pokazali da se u ćelijama koje pojačano ekspimiraju LC3-II i beclin 1 javljaju promene tipične za proces apoptoze. U navedenim istraživanjima razmatrana je inhibicija procesa autofagije kao potencijalna neuroprotektivna strategija kod I/R. Cui i saradnici (2017) su potvrdili ove pretpostavke, na *in vitro* i *in vivo* modelu, i pokazali da upotreba intravenskog anestetika, propofola, može inhibirati proces autofagije smanjujući ekspresiju proteina koji su ključni za njeno odigravanje. Rezultati naše studije ukazuju na aktivaciju procesa autofagije u korteksu i hipokampusu nakon I/R povrede, ali i da postoje razlike u ekspresiji p62 u odnosu na vreme koje je proteklo od ishemije. Najniži nivoi ovog markera zabeleženi su u trećem danu reperfuzije što ukazuje da je proces najintenzivniji u ovom periodu reperfuzije. Zanimljivo je da se ovaj rezultat poklapa sa najnižim nivoom ekspresije VDR-a u obe strukture, ali i sa izuzetno visokom ekspresijom gp91^{phox} i NOX4 u korteksu, kao i sa povišenom ekspresijom pokazatelja procesa apoptoze (kaspaze 3 i AIF). Kako NOX enzimi povećavaju stvaranje O₂⁻ i H₂O₂ moguće je da upravo preko njih utiču na procese autofagije. Brojna istraživanja svedoče o ulozi ROS-a u procesu autofagije, kao i o regulaciji njihove sinteze upravo od strane ovog procesa. Posledice ove interakcije

moгу se manifestovati u različitim patološkim stanjima, kao što su traumatska povreda mozga, ishemija-reperfuzija, gladovanje ili tumorske promene. U našem istraživanju u I/R grupama registrovali smo prisustvo oksidativnog stresa, a zatim i određeni obrazac promena ekspresije proteina autofagije i proteina iz familije NADPH oksidaze. Smatra se da ROS pokreću autofagiju regulatornim mehanizmima na nivou jedra. Povećani nivoi ROS, kao i njihova preterana sinteza aktiviraju redom HIF-1, p53, FOXO3 i NRF2. Ovi transkripcioni faktori indukuju transkripciju BNIP3 i NIX, TIGAR, LC3 i BNIP3 i p62 (Li i sar., 2015). Kako smo u grupama pretretiranim vitaminom D ustanovili njegov protektivan potencijal u smislu održavanja nivoa pokazatelja oksidativnog stresa (O_2^- i MDA) na kontrolnom nivou, kao i pozitivan uticaj enzima antioksidativne zaštite, očekivali smo da će postojati razlika u stepenu autofagije između vitamin D pretretiranih i I/R grupa, međutim ovaj efekat je izostao.

Analizirajući ekspresiju VDR-a, vidimo da je ekspresija u svim vitamin D pretretiranim grupama veća nego u netretiranim, ali je samo u prvom danu nakon ishemije njen nivo veći od kontrole. Ovaj rezultat govori u prilog svrsishodnosti suplementacije vitaminom D, čak i u slučaju adekvatnih nivoa vitamina. Međutim, razlog snižavanja ekspresije VDR-a nakon trećeg dana reperfuzije može biti smanjenje broja ćelija koje ga ekspimiraju ili potrošnja egzogenog aplikovanog vitamina D i smanjena endogena sinteza aktivnog oblika vitamina D, što sugerise da bi postishemijska aplikacija aktivnog oblika vitamina D mogla biti korisna. Zaista, ovo je potvrđeno i u studiji Evansa i saradnika (2018) koji su ispitivali ekspresiju VDR-a, enzima aktivacije vitamina D 1- α -hidroksilaze (CYP27B) i enzima njegove razgradnje 24-hidroksilaze (CYP24A) u mozgu miševa izloženih jednočasovnoj fokalnoj prolaznoj ishemiji i dvadesetčetvoročasovnoj reperfuziji. Pronašli su da je ekspresija VDR i ekspresija vitamin D inaktivirajućeg enzima (CYP24A), bila povišena, dok je ekspresija enzima sinteze ovog vitamina bila snižena. Ovaj nalaz govori da lokalni nivoi aktivne forme vitamina D mogu biti sniženi nakon infarkta mozga i da suplementacija aktivnom formom može biti korisna. Međutim, uticaj vitamina D na autofagiju je dvojak i pokazalo se da se upliće u sve faze toka ovog procesa. Sa jedne strane vitamin D povećava nivo slobodnog Ca^{2+} i posledično smanjuje aktivnost mTOR-a indukujući autofagiju (Yang i sar., 2017). Dalje, vitamin D povećava nivo beklina 1 na nekoliko načina uključujući smanjenje inhibicije Bcl-2, povećanje katelicidina i nishodnu

regulaciju NF- κ B. Zatim prenos signala preko vitamina D pojačava ekspresiju fosfatidilinozitol-3-kinaze – katalitičke jedinice 3 (PI3KC3) koja je zadužena za inicijaciju i maturaciju autofagozoma. Kako bi promovisao elongaciju vitamin D povećava nivo NOD2 (engl, *Nucleotide-binding oligomerization domain 2*) i regrutaciju ATG16, pojačava lizosomalnu proteaznu aktivnost i indukuje autofagozome da se fuzionišu sa lizozomom pomoću proteina sa antimikrobnom aktivnošću - katelicidina (Verway i sar., 2010). Sa druge, vitamin D može uticati na smanjenje autofagije putem različitih mehanizama, pogotovo pod uticajem stresora. Vitamin D može smanjiti nivo NF- κ B, TNF- α ili IFN- γ i tako uticati i na nivo autofagije. Pored toga, vitamin D povećava nivo ciklin zavisne kinaze - p19^{INK4D} koji štiti ćeliju od smrti izazvane autofagijom (Wu i Sun, 2011). Wu i Sun (2011) su zaključili da signali posredovani vitaminom D igraju esencijalnu ulogu za regulaciju autofagije i izbegavanje štete koja može biti uzrokovana autofagijom. Ovu tvrdnju su potvrdili i Yao i saradnici (2015) nakon što su pokazali da VDR agonisti smanjuju broj autofagnih vakuola u ćelijama i uspostavljaju funkcionalnost autofagnog procesa koji je bio poremećen nakon I/R miokarda.

5.3 Uticaj prolazne globalne ishemije mozga džerbila i suplementacije vitaminom D na ćelije CNS-a

Centralni nervni sistem se sastoji iz velikog broja ćelija koje se mogu podeliti u dve kategorije na osnovu svog embrionskog porekla. Neuron, astrociti, oligodendrociti i ependimne ćelije vode poreklo od neuroektoderma, dok od mezenhima poreklo vode ćelije mikroglije, krvni sudovi i meningeae.

Glavne ćelije CNS-a su neuron koji čine njegovu funkcionalnu jedinicu i izuzetno su metabolički aktivni što ih čini vulnerabilnim u uslovima koji narušavaju energetske metabolizam. Neuron sekretuju neurotransmitere i to najčešće glutamat (ekscitatorni neuron), ili γ -aminobuternu kiselinu (GABA; inhibitorni neuron). Mnogi poremećaji CNS-a, kao što su moždani udar, infekcije, trauma mogu nastati bilo gde u CNS-u, a često su praćeni gubitkom neurona. Pored principnih neurona u CNS-u se nalaze i interneuron koji svojim aksonskim terminalima gusto inervišu i principne neurone i susedne interneurone (Solberg, White, i Keller, 1988). Interneuron se još nazivaju i

neuroni sa malim aksonima, jer se njihovi aksoni završavaju na lokalnom nivou, pre nego što daju projekcije u udaljenije zone. Često se može videti da interneuroni prave dentrit-dentrit interakcije između neurona istog tipa i to formiranjem komunikantnih spojeva (*gap junctions*), pre nego hemijskim sinapsama. Na ovaj način oni stvaraju prostorno široke mreže što omogućava sinhronizaciju aktivnosti u odgovoru na aferentne signale (Deans i sar., 2001; Galarreta i Hestrin, 2001). Ove ćelije su inhibitorne i njihov glavni neurotransmiter je GABA. Interneuroni su podeljeni na klase prema morfološkim, neurohemijskim i elektrofiziološkim karakteristikama (Petilja, 2008). Parvalbumin je solubilni protein male molekulske težine, koji ima sposobnost da intenzivno vezuje kalcijum, zbog čega se smatra značajnim u regulaciji intracelularnog nivoa kalcijuma i njegovom saobraćaju (Schwaller i sar., 2002; Arif, 2009). U toku razvoja CNS-a njegova ekspresija je praćena sazrevanjem funkcionalnih neuronskih krugova (Collin i sar., 2005; del Río i sar., 1994). Njega ekspimiraju najveće grupe interneurona korteksa (Fishell, 2007; del Río i sar., 1994; Tamamaki i sar., 2003; Xu i sar., 2010), takozvane košaraste (*Basket cells*) i *Chandelier* ćelije (Meyer i sar., 2002; Gabbott i sar., 1997; Kawaguchi i Kubota, 1993; Inda i sar., 2009). Ovi PV, GABAergički inhibitorni neuroni čine 20% kortikalnih neurona i ključni su za regulaciju balansa između ekscitacije i inhibicije, plastičnosti i funkcionalne arhitektonike neuronskih krugova u korteksu (Markram i sar., 2004). Skorije studije su pokazale da PV interneuroni mogu da vrše modifikaciju senzorne percepcije (Cardin i sar., 2009; Lee i sar., 2012). Dodatno, pokazano je da su abnormalnosti GABA-ergičkog sistema, odnosno poremećaji PV ekspresije, zajednički u mnogim bolestima mozga, uključujući i shizofreniju, bipolarni poremećaj i depresiju (Torrey i sar., 2005, Radonjić i sar.). Pretpostavlja se da do promene u ekspresiji PV dolazi i kod ljudi nakon srčanog zastoja ili operacije na srcu, kao i usled globalne ishemije (McKhann i sar., 1997; Lim i sar., 2004). Parvalbumin ima sposobnost da puferiše kalcijum u ćeliji i to tako što sa velikom afinitetom vezuje Ca^{2+} u citoplazmi ćelija i na taj način održava homeostazu. Ovo je od velikog značaja jer je intracelularni Ca^{2+} uključen u održavanje sinaptičke plastičnosti, ćelijskog rasta i nervne transmisije dok njegovo nagomilavanje dovodi do smrti ćelije i poremećaja na nivou nervnog sistema (Katsura i sar., 1994). U uslovima hipoksije i ishemije dolazi do povećanja intracelularnog Ca^{2+} što dovodi do aktivacije kaspazne kaskade i time i indukcije apoptoze (Berridge i sar., 2000). U

mnogim studijama je pokazano smanjenje nivoa PV nakon izvođenja cerebralne ishemije, što je bilo praćeno povećanim intracelularnim nivoom Ca^{2+} i pojavom toksičnosti glutamata (Koh, 2012a; Koh, 2012b).

U istraživanju koje su sproveli Davoli i saradnici (2000) na Sprague-Dawley pacovima, podvezivanjem obe zajedničke karotidne arterije u trajanju od 3, 5 i 10 minuta, pokazano je da je smanjenje neuronskog markera-NeuN povezano sa procesom apoptoze neurona koja je nastala usled prolazne globalne ishemije mozga (Davoli i sar., 2000). Apoptoza je uočena kod grupa kod kojih je mozak bio u hipoksiji 5 i 10 minuta (Davoli i sar., 2000). Šezdesetih godina prošlog veka pojavili su se prvi podaci o potencijalnom postojanju adultne neurogeneze. Bingham i sar. (2005) su pokazali na džerbilima da ishemijsko oštećenje može dovesti do mitotičke aktivnosti. U ovoj studiji, u grupama koje su bile izložene ishemiji, nakon sedam dana, identifikovano je deset puta više ćelija u hipokampusu nego u kontrolnoj grupi (Bingham i sar., 2005), dok je nakon trideset i više dana od ishemije uočeno je da je broj ćelija u korteksu u grupama izloženim ishemiji bio tri puta veći nego u kontrolnoj grupi (Bingham i sar., 2005). U našem istraživanju je zapaženo da je kod životinja koje su bile izložene I/R ekspresija NeuN markera kao i zastupljenost NeuN pozitivnih ćelija značajno smanjena nakon trećeg dana reperfuzije u obe ispitivane strukture. U životinja pretretiranih vitaminom D ove promene su bile značajno manje iako je sedmog dana reperfuzije još uvek bilo prisutno smanjenje ekspresije ovog markera kao i zastupljenost NeuN+ ćelija u odnosu na kontrolnu grupu. Iako u našem istraživanju posle jednog dana reperfuzije nakon globalne prolazne ishemije mozga nije došlo do promene ekspresije neuronskog markera NeuN kao ni broja ili morfologije ćelija, tehnikom transmisionne elektronske mikroskopije otkrivene su suptilne subćelijske promene u obliku akumulacije transportnih vezikula i rupture membrane kasnih endozoma u ćelijama džerbila podvrgnutih I/R. Ove promene su bile manje izražene u mozgu džerbila tretiranih vitaminom D pre izvođenja I/R. Naši rezultati su u saglasnosti sa istraživanjem Cao i sar. (2010) koji su takođe pokazali odsustvo ishemijskih lezija jedan dan nakon 15 minuta ishemije mozga džerbilima. Ovi autori su, međutim, pronašli ishemijske lezije neposredno nakon ishemije koja su nestale posle 24h, ali su se ponovo pojavile posle 3. dana reperfuzije. Najnovija studija Yuan i saradnika (2017) takođe je pokazala da 20 minuta prolazne globalne ishemije mozga dovodi do odložene neuronske smrti koja je

prisutna nakon 72h reperfuzije. Ovi naučnici su takođe pokazali da su, iako je morfologija neurona bila neoštećena 24 sata nakon reperfuzije, prisutne subcelularne promene u obliku akumulacije oštećenog Golgi kompleksa, transportnih vezikula, kasnih endozoma i ribozoma. Na osnovu navedenih rezultata možemo zaključiti da prolazna globalna ishemija mozga dovodi do promena na subcelularnom nivou već u toku jednog dana nakon ishemije, dok je smanjenje broja neurona primetno trećeg dana nakon ishemije. Pretretman vitaminom D sedam dana pre izvođenja ishemije je očuvao subcelularnu organizaciju ćelije i odložio je promene u broju neurona.

U našoj studiji ekspresija PV markera je imala bifazan tok u obe ispitivane strukture. Mi smo zabeležili nižu ekspresiju prvog i sedmog dana reperfuzije u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim, u trećem danu reperfuzije ekspresija PV i zastupljenost ovih ćelija je imala nivo kontrole (hipokampus) ili je bila i viša od nje (korteks). U hipokampusu pretretman vitaminom D je delovao protektivno i doprineo je značajno višoj ekspresiji PV u odnosu na kontrolnu i odgovarajuće I/R grupe. Različite *postmortem* studije su pokazale da su hipokampalni PV interneuroni otporniji na globalnu prolaznu ishemiju mozga, i to zahvaljujući boljem puferovanju Ca^{2+} jona upravo putem ovih ćelija (Johansen i sar., 1990; Nitsch i sar., 1989; Freund i sar., 1990). Međutim, mi nismo primetili da sličnu otpornost PV interneurona na I/R povredu. Naši rezultati su sugerisali i da postoji recipročan odnos ekspresije NOX2 i PV, odnosno da je povećana ekspresija NOX2 praćena nižom ekspresijom PV. U istraživanju Schiavone i saradnika (2017) pokazano je da je nakon traumatske povrede mozga koja je rezultirala smrtnim ishodom, oksidativni stres u mozgu koji je prouzrokovan povećanjem aktivnosti NOX2 odgovoran za gubitak PV⁺ interneurona. Potpuno paradoksalno, u našem istraživanju nakon tri dana reperfuzije u korteksu ekspresija PV je značajno veća od kontrolnih vrednosti u obe grupe džerbila. U ovom danu, kako je već napomenuto, bili su povišeni i pokazatelji apoptoze i ekspresija NOX2 i NOX4. Moguće je da je ovo povećanje reakcija i pokušaj odbrane od povećane količine slobodnih radikala, i pokušaj da se ćelija sačuva od smrti uzrokovane apoptozom.

U okviru glija ćelija razlikujemo dve velike podgrupe ćelija, a to su mikroglija i makroglija. Ćelije makroglije u koje se ubrajaju astrociti, oligodendrociti, polidendrociti i perineuronalne ćelije koje se ponašaju kao funkcionalni partneri neurona. Sa druge

strane, mikroglia ima imunomodulatornu ulogu (Kim i de Vellis, 2005). Tokom razvića ćelije makroglije se razvijaju iz radijalne glije kao i principalni neuroni, iz ćelijske linije koja je specifična za ćelije korteksa i hipokampusa (Gorski et al., 2002). Ćelije radijalne glije su stem ćelije koje se pod uticajem različitih faktora diferenciraju u principalne neurone, astrocite i oligodendrocite neokorteksa (Gorski i sar., 2002). U adultnom mozgu radijalna glija se označava kao astrocitima slična neuronalna stem ćelija nastanjena u subventrikularnoj zoni (Merkle i sar., 2005). Tokom razvoja, radijalna glija koja je smeštena u neuroepitelu i eksprimira i vimentin i nestin ima sposobnost da se diferencira ili u neuron (Malatesta i sar., 2000) ili u astrocit (Morest i Silver, 2003). Radijalna glija kreće sa stvaranjem astrocita onda kada je neurogeneza kompletirana (Barry i McDermott, 2005), a odnos neurona i glije je od velike važnosti za kortikalnu dinamiku (Giaume i sar., 2010; Schummers i sar., 2008).

Sve do nedavno astrociti su se smatrali potpurnim ćelijama nervnog sistema i gliozna tkiva je smatrana posledicom bolesti i bila je marker da je bolest prisutna. Ideja da disfunkcija astrocita ili reaktivnih astrocita može imati ulogu u mehanizmu nastanka bolesti CNS-a nije postojala. Međutim, pogled na funkciju astrocita se sve više menja od kada je poraslo interesovanje za proučavanje njihove biološke funkcije, kao i uloge u patofiziologiji različitih poremećaja. U proteklih 25 godina postalo je jasno da su astrociti odgovorni za širok spektar kompleksnih i esencijalnih funkcija u zdravom CNS-u. Takođe, razjašnjene su i funkcija i mehanizam reaktivne astroglioze i formiranje glijalnog ožiljka. Danas postoje brojni dokazi o ulozi astrocita u različitim patološkim mehanizmima oštećenja CNS-a (Barres i sar., 2009; De Keyser i sar., 2008; Seiffert, 2006; Sofroniew i sar., 2000; Sofroniew, 2005; Sofroniew, 2009; Takano i sar., 2009). Uloge astrocita u CNS-u su brojne. Oni vrše propagaciju signala (Nedergaard, 2003; Seiffert i sar., 2006), regulišu povećanje intracelularnog Ca^{2+} (Charles i sar., 1991; Cornell-Bell i sar., 1990), povezivanjem u mreže mogu vršiti diseminaciju malih molekula kao što su K^{+} ili glutamat i tako ograničiti njihov toksični potencijal u slučaju nagomilavanja (Seifaert i sar., 2006), imaju ulogu u razvoju sive i bele mase nervnog sistema (Powell i Geller, 1999), učestvuju u formiranju i funkcionisanju sinapsi regulišući protok jona, pH i nivo transmitera u sinaptičkoj pukotini (Barres i sar., 2008; Christopherson i sar., 2005; Ullian i sar., 2001; Brown i Ranson, 2007; Peters i sar., 1991), a imaju i direktnu ulogu u sinaptičkoj transmisiji (Halassa i sar., 2007b;

Nedergaard, 2003; Perea i sar., 2009; Shigetomi i sar., 2008). Astroцити учествују у регулацији тока крви и дијаметара крвног суда (Gordon i sar., 2007; Iadecola i Nedergard, 2007). Такође, могу на локалном нивоу утицати на циркулацију у односу на нервну активност (Seifert i sar., 2006). Astroцити доприносе у одвијању енергетског метаболизма CNS-а и у одржавању крвно-моždане баријере (Abbott i sar., 2006; Ballabh i sar., 2004; Beck i sar., 1984; Savidge i sar., 2007). Различити интерцелуларни сигнални молекули (IL6, TNF- α , TGF- β , IL1, LPS, glutamate, ATP, ROS, hipoksija, deprivacija glukozom, endotelin 1) могу утицати на регулацију ових процеса или довести до реактивне astroglioze (Sofroniew, 2009). До скоро је владало мишљење да је astrogliozа *per se* лоша и да представља феномен који доводи до neurotoksičnosti, inflamacije i хроничног бола. Међутим овај стереотип је превaziђен и данас је познато да нормалан процес реактивне astroglioze не утиче негативно на нервни систем, већ обезбеђује потпору за превaziлажење проблема нарушене homeostaze. Ово се постиже тако што реактивни astroцити преузимају потенцијано ekscitotoksični glutamat (Bush i sar., 1999; Rothstein i sar., 1996; Swanson i sar., 2004), производе glutation, и time štite од oksidativnog stresa (Chen i sar., 2001; Shih i sar., 2003; Swanson i sar., 2004; Vargas i sar., 2008). Neuroprotekciju ostvaruju otpuštanjem adenozina i razgradnjom amyloid- β (Lin i sar., 2008; Koistinaho i sar., 2004). Такође, štite од neurotoksičnih efekata amonijaka (Rao i sar., 2005), olakšavaju popravku крвно моždане баријере (Bush i sar., 1999), smanjuju vazogeni edem nakon traume i šloga (Bush i sar., 1999; Zador i sar., 2009), stabilizuju ekstracelularnu tečnost i balans jona i ograničavaju širenje inflamacije (Bush i sar., 1999; Drogemuller i sar., 2008; Faulkner i sar., 2004; Herrman i sar., 2008; Li i sar., 2008; Myer i sar., 2006; Okada i sar., 2006; Voskuhl i sar., 2009). Paradoksalno, astroцити могу имати i pro i anti inflamatornu ulogu. Oni u prvom trenutku nakon povrede imaju proinflamatornu ulogu, da bi u kasnijem toku poprimili antiinflamatornu ulogu.

Sve je više dokaza koji upućuju da disfunkcija procesa реактивне astroglioze i formiranje ožiljka imaju potencijal da doprinesu ili budu glavni uzrok bolesti CNS-а (Sofroniew, 2009). Neurovaskularna jedinica je koncept po kome su moždani parenhim, njegovi krvni sudovi i glija ćelije koje ih okružuje integrativni sistem (Carmichael, 2006; McCarty, 2009; Saunders i sar., 2008). Važnost ovog koncepta je istaknuta tek kada razmišljamo o funkcionalnom oporavku nakon ishemijskog moždаног udara.

Smatra se da ovo ima praktični značaj u smislu da bi astrociti mogli biti iskorišćeni za određivanje vreme insulta. Naime, nakon ishemijskog infarkta u prva dva dana dolazi do pojave eozinofilije i do influksa polimorfonukleara, zatim se pojavljuju makrofagi (iz krvi ili aktivirana lokalna mikroglia) otprilike oko trećeg do petog dana infarkta i na kraju dolazi do proliferacije astrocita (sedam do 10 dana) na ivicama infarkta. Uloga reaktivne astroglioze u evoluciji ishemičnog moždanog udara nije najjasnija, ali studije pokazuju da tokom prolazne ishemije reaktivni astrociti pružaju metaboličku podršku neuronima, a da ispad ove funkcije ustvari doprinosi neuronskoj degeneraciji (Rossi i sar., 2007; Takano i sar., 2009). Istraživanja na transgenim miševima su pokazala da je nemogućnost formiranja astrocitnog ožiljka nakon moždane ishemije povezana sa gubitkom barijere na marginama infarkta, što rezultira u povećanim širenjem inflamacije i širenjem volumena lezije (Li i sar., 2008). Zanimljiv je i podatak da moždani udar može indukovati neurogenezu i to od strane periventrikularnih neuronskih progenitorskih ćelija koje eksprimiraju GFAP (Ohab i sar., 2006). Smatra se da neuroblasti i nezreli neuroni migriraju u region infarkta gde se blisko povezuju sa malim krvnim sudovima u i oko infarkta. Integritet krvno-moždane barijere se narušava nakon povreda CNS uključujući traumu i šlog. Uloga astrocita u narušavanju ili popravci krvno-moždane barijere nije do kraja razjašnjena, ali je nakon studija na transgenim miševima utvrđeno da nepostojanje reaktivne astroglioze sprečava popravku krvno-moždane barijere (Bush i sar., 1999). Jedna studija je pokazala da transplatacija nezrelih kortikalnih astrocita može da inhibira formiranje ožiljka u adultnom mozgu pacova, i pokazalo se da su ovi astrociti imali sposobnost migracije u okolno tkivo CNS-a i povezivanja sa krvnim sudovima domaćina (Smith and Miller, 1991). U našoj studiji smo pokazali da je ekspresija GFAP proteina povišena u korteksu u svim vitamin D pretretiranim grupama, dok se u hipokampusu ovo povišenje javlja tek od trećeg dana reperfuzije. U I/R grupi povišena ekspresija GFAP proteina je prisutna tek u sedmom danu, što je u saglasnosti sa nalazima drugih, prethodno opisanih istraživanja. Kako vidimo vitamin D utiče povoljno na ekspresiju GFAP proteina, te možemo zaključiti da ima protektivan uticaj na preživljavanje astrocita u uslovima prolazne globalne ishemije. Takođe je moguće da je pretretman vitaminom D doprineo reaktivnosti astrocita, koji obezbeđuju uslove za neuroprotekciju, oporavak i regeneraciju tkiva. Zanimljivo je ostvrnuti se na podatke o ćelijama radijalne glije, odnosno neuronalnim

stem ćelijama koje eksprimiraju GFAP protein i koje imaju mogućnost da se razviju u nervne ćelije i da je možda jedan deo GFAP ekspresije u našem istraživanju porekla upravo ovih ćelija.

Ćelije mikroglije predstavljaju efektorne ćelije urođene imunosti CNS-a, koje vode poreklo od proliferacije lokalnih ćelija CNS-a, kao i od mijeloidnih progenitora koji su migrirali u CNS. One se često opisuju kao mirujuće, odnosno razgranate, i aktivirane, Mirujuća mikroglija ima malo, tamno jedro sa kondenzovanim hromatinom i znatno su manje od astrocita, a citoplazma im je neupadljiva. Sasvim suprotno od njih, aktivna mikroglija je proširena zbog fagocitovanog materijala i podseća na penaste makrofage. Odgovor na cerebralnu ishemiju je uglavnom posredovan urođenim imunim mehanizmima od strane lokalnih ćelija CNS-a, odnosno mikroglije (Schilling i sar., 2003). U roku od dva do sedam dana ovo zajedno sa drugim faktorima vodi ka regrutaciji neutrofila i makrofaga iz cirkulacije (Chu i sar., 2014; Gelderblom i sar., 2009; Schilling i sar., 2003). Smatra se da u akutnoj fazi mikroglija i makrofagi imaju najveći uticaj u inflamatornom odgovoru (Benakis i sar., 2014; Iadecola i Anrather, 2011a). Na mestu cerebralne ishemije neki aspekti inflamacije doprinose neurološkom deficitu i oštećenju tkiva, dok drugi mogu biti korisni (Denes i sar., 2011; Kamel i Iadecola, 2012). Sve je više dokaza koji opisuju mikrogliju i makrofage kao ćelije velike plastičnosti čiji je fenotip pod uticajem okruženja i fagocitovanog sadržaja (Benakis i sar., 2014; ElAli i LeBlanc, 2016). Mikroglija reaguje brzo na otpuštanje ATP-a na mestu povrede i gusto opkoljava leziju (Davalos i sar., 2005; Hines i sar., 2009). Iscrpljivanje mikroglije rezultuje u povećanju lezije ili veličine infarkta (Lancette-Hebert i sar., 2007; Montero i sar., 2009; Szalay i sar., 2016). Obrnuto, kontinuirana aktivacija mikroglije i makrofaga dovodi do produkcije citokina i sinteze ROS koji mogu indukovati sekundarnu povredu i uticati negativno na ishod (Cuartero i sar., 2015; Iadecola i Anrather, 2011a). Nekoliko studija se bavilo karakterizacijom fenotipa i funkcionalnim učinkom mikroglije i makrofaga u različitim animalnim modelima cerebralne ishemije i pokazano je da je mikroglija smanjena od trećeg do sedmog dana nakon insulta, kao i da ove dve grupe ćelija vrše različite proinflamatorne faktore, što sugerise na moguće različitu ulogu koju imaju u cerebralnoj ishemiji. Pokazana je ekspresija TNF- α u mikrogliji, pogotovo u kasnijem period (treći i sedmi dan) (Lambertsen i sar., 2009) i u periinfarktnoj zoni, što se dovodi u vezu sa

ograničavanjem lezije i očuvanjem neurona i glija ćelija (Bruce i sar., 1996; Clausen i sar., 2016; Romera i sar., 2004). Ovi naučnici su takođe pokazali da je nakon transplatacije koštane srži *chimera* miša mikroglijalni TNF- α imao protektivnu ulogu u permanentnoj cerebralnoj ishemiji. Takođe je pokazano da reaktivni astrociti ekspimiraju IL-1 β i time održavaju okvire lezije i sprečavaju širenje i infiltraciju imunih ćelija u periinfarktnu zonu (Bush et al., 1999). U našem istraživanju ekspresija Iba1 markera mikroglije je u uslovima I/R bila smanjena u korteksu u svim praćenim periodima reperfuzije, dok je u hipokampusu ovaj pad ekspresije bio prisutan samo jedan dan nakon I/R. Povećana ekspresija ovog markera bila je prisutna u vitaminom D pretretiranim džerbilima posle tri (hipokampus), odnosno sedam (korteks) dana reperfuzije. Imunohistohemijskim analizama smo uočili da su aktivirane Iba1 ćelije bile prisutne nakon trećeg dana ishemije u obe ispitivane strukture. Porast ekspresije i broja ćelija u vitaminom D pretretiranim grupama, a na osnovu prethodno iznetih saznanja govori u prilog protektivnog dejstva vitamina D s obzirom da se mikroglija smatra faktorom koji doprinosi prevazilaženju povrede koje je I/R izazvala (Bruce i sar., 1996; Clausen i sar., 2016; Romera i sar., 2004). Pored toga što Iba1 može biti povišena u smislu odbrane tkiva, ona takođe može uticati na uklanjanje astrocita, koji su kako smo videli povišeni u vitaminom D pretretiranim grupama. Ovo je možda način na koji vitamin D ostvaruje koordinisanu regulaciju aktivnosti i prisustva ovih ćelija u CNS-u.

6. ZAKLJUČCI

1. Prolazna globalna ishemija mozga dovodi do pojave oksidativnog stresa koji se manifestuje povećanjem nivoa MDA i O_2^- , smanjenjem nivoa GSH i SH grupa kao i promenama u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u obe ispitivane strukture mozga džerbila. Promene su najizraženije posle prvog dana reperfuzije. U korteksu se smanjuju posle tri dana i uglavnom vraćaju na vrednosti u kontrolnoj grupi nakon sedam dana reperfuzije. U hipokampusu se takođe posle tri dana zapaža tendencija normalizacije pokazatelja oksidativnog stresa, ali se sedmog dana zapaža ponovni porast koncentracije MDA.

2. Pretretman vitaminom D tokom sedam dana pre izlaganja džerbila prolaznoj globalnoj ishemiji mozga uticao je na smanjenje oksidativnog stresa u korteksu i hipokampusu eksperimentalnih životinja. U grupama životinja koje su tretirane vitaminom D pre I/R nivoi MDA i O_2^- su bili značajno niži u odnosu na odgovarajuće I/R grupe u svim praćenim periodima reperfuzije, aktivnost enzima antioksidativne odbrane uglavnom bila povećana u obe strukture tokom reperfuzije.

3. Prolazna globalna ishemija mozga izazvala je promene u ekspresiji NOX2 i NOX4. Najizraženija je bila promena u ekspresiji gp91^{phox} koja je bila povećana u korteksu u svim ispitivanim periodima reperfuzije, a u hipokampusu u prvom i sedmom danu. Ostale subjedinice NOX2 (p22^{phox}, p47^{phox} i p67^{phox}) su odreagovale strukturno specifično u odnosu na dužinu trajanja reperfuzije. Ekspresija NOX4 je bila povećana samo u korteksu i to u trećem danu reperfuzije.

4. Vitamin D je uticao na normalizaciju ekspresije NOX2 (gp91^{phox}) koja je u korteksu posle prvog dana reperfuzije bila u nivou vrednosti u kontroli dok je posle tri i sedam dana bila značajno niža nego u odgovarajućim I/R grupama iako još uvek viša nego u kontrolnoj grupi. U hipokampusu je vitamin D uticao na vraćanje ekspresije ove subjedinice NOX2 na vrednosti u kontroli u svim praćenim periodima reperfuzije. Vitamin D je, kao i sam proces I/R, pokazao različit uticaj na ekspresiju drugih subjedinica NOX2 i nije uticao na zapažene promene ekspresije NOX4.

5. Prolazna globalna ishemija i reperfuzija su bile praćene značajnim intenziviranjem procesa apoptoze samo u korteksu i to posle tri dana reperfuzije. Značajno povećanje autofagije bilo je prisutno u obe ispitivane strukture u svim periodima reperfuzije ali je ovaj proces bio najintenzivniji posle tri dana.

6. Pretretman vitaminom D tokom sedam dana pre izlaganja džerbila prolaznoj globalnoj ishemiji mozga nije pokazao uticaj na pojavu procesa apoptoze i autofagije.

7. Prolazna globalna ishemija i reperfuzija izazvale su smanjenje broja neurona u korteksu i hipokampusu nakon trećeg dana reperfuzije koje je bilo manifestno i nakon sedam dana. Ekspresija PV i broj PV+ ćelija su bili smanjeni posle jednog i sedam dana reperfuzije, ali je ekspresija PV bila povećana posle tri dana. Ekspresija GFAP proteina i broj GFAP+ ćelija su bili povećani u obe ispitivane strukture posle sedam dana, dok su ekspresija Iba1 bila smanjena u svim periodima reperfuzije. Međutim, analiza morfologije Iba+ ćelija pokazala je da su posle tri i sedam dana reperfuzije ove ćelije poprimile ameboidni oblik ukazujući na njihovu aktivaciju.

8. Pretretman vitaminom D tokom sedam dana pre izlaganja džerbila prolaznoj globalnoj ishemiji mozga je sprečio smanjenje broja neurona trećeg dana, ali je broj ovih ćelija nakon sedam dana reperfuzije bio značajno niži u odnosu na kontrolnu grupu. Vitamin D je delovao protektivno na PV+ ćelije na strukturno specifičan način. Vitamin D je pokazao uticaj na proliferaciju astrocita u korteksu posle tri dana, a u hipokampusu već posle prvog dana reperfuzije. Vitamin D je uticao na povećanu ekspresiju markera mikroglije posle sedam dana reperfuzije u korteksu, odnosno tri dana reperfuzije u hipokampusu.

9. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je suplementacija vitaminom D od značaja za smanjenje oštećenja mozga koje pokreću procesi ishemije i reperfuzije. Neophodna su dalja istraživanja u kojima bi se ispitali efekti suplementacije pre ishemije, ali i terapijskog davanja vitamina D po nastaloj ishemiji u uslovima hipovitaminoze vitamina D.

7. LITERATURA

Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41–53

Abramov AY, Canevari L, Duchen MR. Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochim Biophys Acta* 1742: 81–87, 2004.

Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 353: 668–670, 1991.

Adibhatha RM, Hatcher JF. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 2010; 12:125–169

Alfieri, D.F., Lehmann, M.F., Oliveira, S.R., Flauzino, T., Delongui, F., de Araujo, M.C., Dichi, I., Delfino, V.D., Mezzaroba, L., Simao, A.N., i sar., 2017. Vitamin D deficiency is associated with acute ischemic stroke, C-reactive protein, and shortterm outcome. *Metab. Brain Dis.* 32, 493-502.

Arif SH. A Ca(2p)-binding protein with numerous roles and uses: parvalbumin in molecular biology and physiology. *Bioessays* 2009;31(4):410–421.

Atkins CM, Sweatt JD. Reactive oxygen species mediate activity dependent neuron-glia signaling in output fibers of the hippocampus. *J Neurosci* 19: 7241–7248, 1999.

Aw, T. Y. (2003) Cellular redox: a modulator of intestinal epithelial cell proliferation. *News Physiol. Sci.* 18: 201–204.

Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 52: 741–744, 1973.

Bacigaluppi M, Comi G, Hermann DM. Animal Models of Ischemic Stroke. Part Two: Modeling Cerebral Ischemia. *The Open Neurology Journal*. 2010;4:34-38. doi:10.2174/1874205X01004020034.

Baines CP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res. Cardiol*. 2009a; 104:181–188.

Baines CP. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2009b; 46:850–857.

Baines CP. The cardiac mitochondrion: nexus of stress. *Annu. Rev. Physiol*. 2010; 72:61–80

Balden R, Selvamani A, Sohrabji F. Vitamin D deficiency exacerbates experimental stroke injury and dysregulates ischemia-induced inflammation in adult rats. *Endocrinology*.2012;153:2420–2435.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16:1–13

Bánfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem*. 2004;279(44):46065-72

Barres BA (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60:430–440

Barry, D., and McDermott, K. (2005). Differentiation of radial glia from radial precursor cells and transformation into astrocytes in the developing rat spinal cord. *Glia* 50, 187–197.

Beck DW, Vinters HV, Hart MN, Cancilla PA (1984) Glial cells influence polarity of the blood-brain barrier. *J Neuropathol Exp Neurol* 43:219–224

Benakis, C., Garcia-Bonilla, L., Iadecola, C., Anrather, J., 2014. The role of microglia and myeloid immune cells in acute cerebral ischemia. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 461.

Bedard K, Krause KH. The Nox family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 2007; 87:245-313.

Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. The versatility and universality of calcium signaling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1 (2000) 11–21.

Bhattarai, P., Bhattarai, J.P., Kim, M.S., Han, S.K., 2016. Non-genomic action of vitamin D3 on N-methyl-D-aspartate and kainate receptor-mediated actions in juvenile gonadotrophin-releasing hormone neurons. *Reprod. Fertil. Dev*

Bingham B, Liu D, Wood A, Cho S. Ischemia-stimulated neurogenesis is regulated by proliferation, migration, differentiation and caspase activation of hippocampal precursor cells. *Brain Res.* 2005;1058(1-2):167-77. Bjørkøy G, Lamark T, Johansen T (2006) p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery. *Autophagy* 2: 138–139.

Blatow M, Rozov A, Katona I et al. A novel network of multipolar bursting interneurons generates theta frequency oscillations in neocortex. *Neuron* 2003;38(5):805–817.

Boontanart, M., Hall, S.D., Spanier, J.A., Hayes, C.E., Olson, J.K., 2016. Vitamin D3 alters microglia immune activation by an IL-10 dependent SOCS3 mechanism. *J. Neuroimmunol.* 292, 126-136.

Boyan, B.D., Sylvia, V.L., Dean, D.D., Del Toro, F., Schwartz, Z., 2002. Differential regulation of growth plate chondrocytes by 1 α ,25-(OH)₂D₃ and 24R,25-(OH)₂D₃ involves cell-maturation-specific membrane-receptor-activated phospholipid metabolism. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13, 143e154.

Bramlett M, Helen & Dalton Dietrich, W. (2004). Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: Similarities and DIFFERENCES. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* : official journal of the International Society of Cerebral

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54

Blood Flow and Metabolism. 24. 133-50. 10.1097/01.WCB.0000111614.19196.04.

Brewer LD, Thibault V, Chen KC, Langub MC, Landfield PW, Porter NM: Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2001;21:98-108.

Brown AM, Ransom BR (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55:1263–1271

Bruce, A.J., Boling, W., Kindy, M.S., Peschon, J., Kraemer, P.J., Carpenter, M.K., Holtsberg, F.W., Mattson, M.P., 1996. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat. Med.* 2, 788–794.

Bush TG NP, Horner CH, Polito A, Ostefeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV (1999) Leukocyte infiltration, neuronal degeneration and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23:297–308

Bushong EA, Martone MA, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 atratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22:183–192

Buitrago, C., Boland, R., 2010. Caveolae and caveolin-1 are implicated in 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$ -dependent modulation of Src, MAPK cascades and VDR localization in skeletal muscle cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 121, 169e175.

Candelario-Jalil E ; Mhadu N.H.; Al-Dalain S.M.; Martínez G and León O.S. Time course of oxidative damage in different brain regions following transient cerebral ischemia in gerbils. *Neuroscience Research* 41(3): 233-241 (2001)

Cao G, Clark R, Pei W et al. Translocation of Apoptosis-Inducing Factor in Vulnerable Neurons After Transient Cerebral Ischemia and in Neuronal Cultures After Oxygen-Glucose Deprivation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2003; 23:1137–1150.

Cao F, Hata R, Zhu P, Takeda S, Yoshida T, Hakuba N, Sakanaka M, Gyo K. Delayed neuronal cell death in brainstem after transient brainstem ischemia in gerbils. *BMC Neurosci.* 2010 Sep 14;11:115. doi: 10.1186/1471-2202-11-115

Cao, W., Carney, J.M., Duchon, A., Floyd, R.A., Chevion, M., 1988. Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. *Neurosci. Lett.* 88, 233-238.

Cardin JA, Carle'n M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, Tsai LH, Moore CI (2009) Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459:663– 667.

Casas AI, et al. (2015) Reactive oxygen-related diseases: Therapeutic targets and emerging clinical indications. *Antioxid Redox Signal* 23:1171–1185.

Chan, P.H., 1996. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27, 1124-1129.

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

Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985;113:484–90.

Carloni S, Buonocore G, Balduini W (2008) Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiol Dis* 32: 329–339.

Carmichael ST (2006) Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: making waves. *Ann Neurol* 59:735–742

Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ (1991) Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6:983–992

Charriaut-Marlangue C, Margail I, Represa A, Popovici T, Plotkine M, Ben-Ari Y (1996) Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:186–194

Chen L, Knowlton AA. Mitochondria and heart failure: new insights into an energetic problem. *Minerva Cardioangiol.* 2010; 58:213–229.

Chen Y, Vartiainen NE, Ying W, Chan PH, Koistinaho J, Swanson RA Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. *J Neurochem* (2001) 77:1601–1610

Chen, J., Olivares-Navarrete, R., Wang, Y., Herman, T.R., Boyan, B.D., Schwartz, Z., Protein-disulfide isomerase-associated 3 (Pdia3) mediates the membrane response to 1,25-dihydroxyvitamin D3 in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 2010. 285, 37041e37050.

Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, Maier CM, Narasimhan P, Goeders CE, Chan PH. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal* 2011;14(8):1505-17.

Chen H, Song YS, Chan PH Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* (2009) 29:1262–1272.

Chen, J., Doroudi, M., Cheung, J., Grozier, A.L., Schwartz, Z., Boyan, B.D. Plasma membrane Pdia3 and VDR interact to elicit rapid responses to 1 α ,25(OH)₂D₃. *Cell Signal* 2013; 25, 2362e2373.

Chrissobolis S and Faraci FM. The role of oxidative stress and NADPH oxidase in cerebrovascular disease. *Trends Mol Med* 14: 495–502, 2008.

Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120:421–433

- Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L., & Carmeliet, G. (2016). Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiological Reviews*, 96(1), 365–408. <http://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015>
- Chu, H.X., Kim, H.A., Lee, S., Moore, J.P., Chan, C.T., Vinh, A., Gelderblom, M., Arumugam, T.V., Broughton, B.R., Drummond, G.R., et al., 2014. Immune cell infiltration in malignant middle cerebral artery infarction: comparison with transient cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 450–459
- Clausen, B.H., Degn, M., Sivasaravanaparan, M., Fogtman, T., Andersen, M.G., Trojanowsky, M.D., Gao, H., Hvidsten, S., Baun, C., Deierborg, T., et al., 2016. Conditional ablation of myeloid TNF increases lesion volume after experimental stroke in mice, possibly via altered ERK1/2 signaling. *Sci Rep* 6, 29291.
- Collin T, Chat M, Lucas MG, Moreno H, Racay P, Schwaller B, Marty A, Llano I. Developmental changes in parvalbumin regulate presynaptic Ca²⁺ signaling. *J Neurosci* 2005;25(1):96–107.
- Cuartero, M.I.I., Ballesteros, I., Lizasoain, I., Moro, M.A.A., 2015. Complexity of the cell-cell interactions in the innate immune response after cerebral ischemia. *Brain Res.* 1623, 53–62.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470–473
- Cui X, Gooch H, Petty A, McGrath JJ, Eyles D. Vitamin D and the brain: Genomic and non-genomic actions. *Mol Cell Endocrinol.* 2017 Sep 15;453:131-143. doi: 10.1016/j.mce.2017.05.035. Epub 2017
- Dai Y, Zhang H, Zhang J, Yan M. Isoquercetin attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis after ischemia/reperfusion injury via Nrf2-mediated inhibition of the NOX4/ROS/NF- κ B pathway. *Chem Biol Interact.* 2018;284:32-40.

Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., Gan, W.B., 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8, 752–758.

Davoli MA, Fourtounis J, Tam J, et al. Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat. *Neuroscience.* 2002;115(1):125-36.

Deans MR, Gibson JR, Sellitto C, Connors BW, Paul DL. Synchronous activity of inhibitory networks in neocortex requires electrical synapses containing connexin36. *Neuron* 2001;31(3):477–485.

Denes, A., McColl, B.W., Leow-Dyke, S.F., Chapman, K.Z., Humphreys, N.E., Grecis, R.K., Allan, S.M., Rothwell, N.J., 2011. Experimental stroke-induced changes in the bone marrow reveal complex regulation of leukocyte responses. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 1036–1050

De Keyser J, Mostert JP, Koch MW (2008) Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *J Neurol Sci* 267:3–16

Deng YH, He HY, Yang LQ, Zhang PY. Dynamic changes in neuronal autophagy and apoptosis in the ischemic penumbra following permanent ischemic stroke. *Neural Regen Res.* 2016;11(7):1108-14.

Dick IM, Prince RL, Kelly JJ, Ho KK (1995) Oestrogen effects on calcitriol levels in post-menopausal women: a comparison of oral versus transdermal administration. *Clin Endocrinol (Oxf)* 43:219–224.

Di Lisa F, Kaludercic N, Carpi A, Menabo R, Giorgio M. Mitochondria and vascular pathology. *Pharmacol. Rep.* 2009; 61:123–130

Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, et al. Independent association of low serum 25 hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch InternMed.* 2008; 168:1340–1349.

Dong J, Wong SL, Lau CW, Lee HK, Ng CF, Zhang L, Yao X, Chen ZY, Vanhoutte PM, Huang Y (2012) Calcitriol protects renovascular function in hypertension down-regulating angiotensin II type 1 receptors and reducing oxidative stress. *Eur Heart J.* 33(23):2980-90

Drogemuller K, Helmuth U, Brunn A, Sakowicz-Burkiewicz M, Gutmann DH, Mueller W, Deckert M, Schluter D (2008) Astrocyte gp130 expression is critical for the control of *Toxoplasma* encephalitis. *J Immunol* 181:2683–269

Durk, M.R., Chan, G.N., Campos, C.R., Peart, J.C., Chow, E.C., Lee, E., Cannon, R.E., Bendayan, R., Miller, D.S., Pang, K.S., 2012. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃-liganded vitamin D receptor increases expression and transport activity of Pglycoprotein in isolated rat brain capillaries and human and rat brain microvessel endothelial cells. *J. Neurochem.* 123, 944-953.

Živković M, Šternić N, Kostić VS (2000): *Ishemička bolest mozga*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva

Ekici F., Ozyurt B., Erdogan H. “The combination of vitamin D₃ and dehydroascorbic acid administration attenuates brain damage in focal ischemia,” *Neurological Sciences*, vol. 30, no. 3, pp. 207–212, 2009. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82:70–7.

Evans, P.H., 1993. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br. Med. Bull.* 49, 577-587.

Eyles, D.W., Feron, F., Cui, X., Kesby, J.P., Harms, L.H., Ko, P., McGrath, J.J., Burne, T.H., 2009. Developmental vitamin D deficiency causes abnormal brain development. *Psychoneuroendocrinology* 34 (Suppl 1), S247-S257

Eyles, D., Brown, J., Mackay-Sim, A., McGrath, J., Feron, F., 2003. Vitamin D₃ and brain development. *Neuroscience* 118, 641-653.

Eyles, D.W., Smith, S., Kinobe, R., Hewison, M., McGrath, J.J., 2005. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J. Chem. Neuroanat.* 29, 21-30.

Facchinetti, F., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 1998. Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cell Mol. Neurobiol.* 18, 667-682.

Fang, Y. Z., Yang, S. & Wu, G. (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18:872–879.

Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 24:2143–2155

Fishell G, Hanashima C. Pyramidal neurons grow up and change their mind. *Neuron* 2008;57(3):333–338.

Freund TF, Buzsaki G, Leon A, Baimbridge KG, Somogyi P. Relationship of neuronal vulnerability and calcium binding protein immunoreactivity in ischemia. *Exp Brain Res* 1990;83 (1):55– 66.

Fu J, Xue R, Gu J, Xiao Y, Zhong H, Pan X, Ran R (2013) Neuroprotective effect of calcitriol on ischemic/reperfusion injury through the NR3A/CREB pathways in the rat hippocampus. *Mol Med Rep.* 8(6):1708-14

Fu, G.K., Lin, D., Zhang, M.Y., Bikle, D.D., Shackleton, C.H., Miller, W.L., Portale, A.A., 1997. Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type 1. *Mol. Endocrinol.* 11, 1961e1970.

Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Murakami K, Kawase M, ChanPH (1998) Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1239–1247

Fulton Đ. Nox5 and the regulation of cellular function. *Antioxid Redox Signal* 11: 2443–2452, 2009.

Gabbott PL, Dickie BG, Vaid RR, Headlam AJ, Bacon SJ. Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: morphology and quantitative distribution. *J Comp Neurol* 1997;377(4):465–499.

Galarreta M, Hestrin S. Frequency-dependent synaptic depression and the balance of excitation and inhibition in the neocortex. *Nat Neurosci* 1998;1(7):587–594.

Galarreta M, Hestrin S. Electrical synapses between GABA-releasing interneurons. *Nat Rev Neurosci* 2001;2(6):425–433.

Gao, L., Jiang, T., Guo, J., Liu, Y., Cui, G., Gu, L., ... Zhang, Y. (2012). Inhibition of Autophagy Contributes to Ischemic Postconditioning-Induced Neuroprotection against Focal Cerebral Ischemia in Rats. *PLoS ONE*, 7(9), e46092. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0046092>

Garcia-Segura LM, Melcangi RC (2006) Steroids and glial cell function. *Glia* 54:485–498

Gelderblom, M., Leypoldt, F., Steinbach, K., Behrens, D., Choe, C.-U., Siler, D.A., Arumugam, T.V., Orthey, E., Gerloff, C., Tolosa, E., et al., 2009. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* 40, 1849–1857.

Gezen-Ak, D., Dursun, E., Yilmazer, S., 2011. The effects of vitamin D receptor silencing on the expression of LVSCC-A1C and LVSCC-A1D and the release of NGF in cortical neurons. *PLoS One* 6, e17553.

Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 2010;11(2):87–99.

Go YM, Park H, Koval M, Orr M, Reed M, Liang Y, et al. A key role for mitochondria in endothelial signaling by plasma cysteine/cystine redox potential. *Free Radic. Biol. Med.* 2010; 48:275–283.

Gorski JA, Talley T, Qiu M, Puellas L, Rubenstein JLR, Jones KR. Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J Neurosci* 2002;22(15):6309–6314.

Gordon GR, Mulligan SJ, MacVicar BA (2007) Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia* 55:1214–1221

Gottlieb RA, Mentzer RM. Autophagy during cardiac stress: joys and frustrations of autophagy. *Annu. Rev. Physiol.* 2010; 72:45–59.

Groves, N.J., McGrath, J.J., Burne, T.H., 2014. Vitamin D as a neurosteroid affecting the developing and adult brain. *Annu. Rev. Nutr.* 34, 117-141.

Günzler WA, Kremers H, Flohé L. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9-) in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem* 1974;12:444–8.

Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG (2007a) Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci* 27:6473–6477

Halassa MM, Fellin T, Haydon PG (2007b) The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* 13:54–63

Hafeez B.B., Siddiqui I.A, Asim M., Malik A., Afaq F., Adhami V.M., Saleem M., Din M., Mukhtar H. A dietary anthocyanidin delphinidin induces apoptosis of human prostate cancer PC3 cells in vitro and in vivo: involvement of nuclear factor- κ B signaling, *Canc. Res.* 68 (2008) 8564–8572.

Hagan CE, Bolon B, Keene CD. Nervous System. In *Comparative Anatomy and Histology*. Elsevier Inc.2012. p. 339-394. Available from, DOI: 10.1016/B978-0-12-381361-9.00020-2

Halestrap AP. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem. Soc. Trans.* 2010; 38:841–860

Hammack BN, Fung KY, Hunsucker SW, Duncan MW, Burgoon MP, Owens GP, Gilden DH. Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Mult Scler* 2004; 10:245–260.

Haussler, M.R., Whitfield, G.K., Kaneko, I., Haussler, C.A., Hsieh, D., Hsieh, J.C., Jurutka, P.W., 2013. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcif. Tissue Int.* 92, 77-98.

He C, Klionsky D. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 2009; 43:67–93.

Herrmann JE, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen TK, Korsak RA, Takeda K, Akira S, Sofroniew MV (2008) STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci* 28:7231–7243

Hines, D.J., Hines, R.M., Mulligan, S.J., Macvicar, B.A., 2009. Microglia processes block the spread of damage in the brain and require functional chloride channels. *Glia* 57, 1610–1618.

Hirata M, Serizawa K, Aizawa K, Yogo K, Tashiro Y, Takeda S, Moriguchi Y, Endo K, Fukagawa M. (2013) 22-Oxacalcitriol prevents progression of endothelial dysfunction through antioxidative effects in rats with type 2 diabetes and early-stage nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 28:1166–1174.

Hollenbeck P. J. Products of endocytosis and autophagy are retrieved from axons by regulated retrograde organelle transport. *Journal of Cell Biology* 1993; 121:305-315.

Hong H, Zeng J-S, Kreulen DL, Kaufman DI, Chen AF (2006) Atorvastatin protects against cerebral infarction via inhibition of NADPH oxidase-derived superoxide in ischemic stroke. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H2210–5

S. Hong, J. Kwon, D.W. Kim, H.J. Lee, D. Lee, W. Mar, Mulberrofuran g protects ischemic injury-induced cell death via inhibition of NOX4-mediated ROS generation and ER stress, *Phytother Res.* 31 (2017) 321–329.

Hu MC, Shiizaki K, Kuro O, Moe OW. Fibroblast growth factor 23 and klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:503-533.

Inda MC, DeFelipe J, Muñoz A. Morphology and distribution of chandelier cell axon terminals in the mouse cerebral cortex and claustramygdaloid complex. *Cereb Cortex* 2009;19(1):41–54.

Iadecola, C., Anrather, J., 2011a. Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions. *Nat. Neurosci.* 14, 1363–1368.

Iadecola, C., Anrather, J., 2011b. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat. Med.* 17, 796–808.

Iadecola C, Nedergaard M (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* 10:1369–1376

Ishimura, R., Martin, G.R., Ackerman, S.L., 2008. Loss of apoptosis- inducing factor results in cell-type-specific neurogenesis defects. *J Neurosci* 28, 4938–4948.

Johansen FF, Tønder N, Zimmer J, Baimbridge GK, Diemer HN. Short-term changes of parvalbumin and calbindin immunoreactivity in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *Neurosci letters.* 1990;120(2):171-74.

Jovičić S, Ignjatović S, Majkić-Singh N. Biohemija i metabolizam vitamina D. *J Med Biochem* 2012; 31: 309-15.

Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, et al. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19: 5720–5728.

Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *International review of cell and molecular biology.* 2012;298:229-317. doi:10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7.

Kahles, T. & Brandes, R.P. Which NADPH Oxidase Isoform Is Relevant for Ischemic Stroke? The Case for Nox 2 Cell. *Mol. Life Sci.* (2012) 69: 2345. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1011-8>

Kamel, H., Iadecola, C., 2012. Brain-immune interactions and ischemic stroke: clinical implications. *Arch. Neurol.* 69, 576–581.

Katsura K., Kristián T., Siesjö B.K. Energy metabolism ion homeostasis, and cell damage in the brain, *Biochem. Soc. Trans.* 22 (1994) 991–996.

Katsuyama, M., Matsuno, K., & Yabe-Nishimura, C. (2012). Physiological roles of NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 50(1), 9–22. <http://doi.org/10.3164/jcbn.11-06SR>.

Kawaguchi Y. Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. *J Neurosci* 1995;15(4):2638–2655.

Kawaguchi Y, Kubota Y. Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28kimmunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J Neurophysiol* 1993;70(1):387–396.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239–257

Kestenbaum B, Katz R, de Boer I, et al. Vitamin D, parathyroid hormone, and cardiovascular events among older adults. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58:1433–1441.

Kew RR, Webster RO (1988) Gc-globulin (vitamin D-binding protein) enhances the neutrophil chemotactic activity of C5a and C5a des Arg. *J Clin Invest* 82:364–369.

Kihara S, Shiraishi T, Nakagawa S, Toda K, Tabuchi K. Visualization of DNA double strand breaks in the gerbil hippocampal CA1 following transient ischemia. *Neurosci Lett* 1994; 175:133–136.

Kilkkinen A, Knekt P, Aro A, et al. Vitamin D status and the risk of cardiovascular disease death. *Am J Epidemiol.* 2009;170:1032–1039.

Kim Su, de Vellis J. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 2005;81(3):302–313.

Kim GS, Jung JE, Niizuma K, Chan PH (2009) CK2 is a novel negative regulator of NADPH oxidase and a neuroprotectant in mice after cerebral ischemia. *J Neurosci* 29:14779–89

Kitagawa K, Matsumoto M, Oda T, Niinobe M, Hata R, Handa N, Fukunaga R, Isaka Y, Kimura K, Maeda H, et al. Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death. *Neuroscience.* 1990;35(3):551-8.

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. *Science* 169: 1095–1097, 1970.

Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature.* 2002 Sep 26;419(6905):367-74. PubMed PMID: 12353028.

Kleinschnitz, C., Grund, H., Wingler, K., Armitage, M. E., Jones, E., Mittal, M., ... Schmidt, H. H. W. (2010). Post-Stroke Inhibition of Induced NADPH Oxidase Type 4 Prevents Oxidative Stress and Neurodegeneration. *PLoS Biology*, 8(9), e1000479. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000479>

Kizildag, S., Ates, H., Kizildag, S., 2010. Treatment of K562 cells with 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces distinct alterations in the expression of apoptosis-related genes BCL2, BAX, BCLXL, and p21. *Ann. Hematol.* 89, 1e7.

Ko, P., Burkert, R., McGrath, J., Eyles, D., 2004. Maternal vitamin D3 deprivation and the regulation of apoptosis and cell cycle during rat brain development. *Brain Res. Dev.* Brain Res. 153, 61e68.

Koh P.O. Ischemic injury decreases parvalbumin expression in a middle cerebral artery occlusion animal model and glutamate-exposed HT22 cells, *Neurosci. Lett.* 14 (2012) 17–21.

Koh P.O., Ginkgo biloba extract (EGb 761) attenuates ischemic brain injury-induced reduction in Ca²⁺ sensor protein hippocalcin, *Lab. Anim. Res.* 28 (2012) 199–204.

Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, Gotoh K, Komatsu M, et al. (2008) Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol* 172: 454–469.

Koistinaho M, Lin S, Wu X, Esterman M, Koger D, Hanson J, Higgs R, Liu F, Malkani S, Bales KR, Paul SM (2004) Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med* 10:719–726

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009; 16:3–11.

Kusaka I, Kusaka G, Zhou C, Ishikawa M, Nanda A, Granger DN, Zhang JH, Tang J (2004) Role of AT1 receptors and NAD(P)H oxidase in diabetes-aggravated ischemic brain injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H2442–51

Kvietys PR, Granger DN. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* 2012; 52:556–592

Langub, M.C., Herman, J.P., Malluche, H.H., Koszewski, N.J., 2001. Evidence of functional vitamin D receptors in rat hippocampus. *Neuroscience* 104, 49-56

Lambertsen, K.L., Clausen, B.H., Babcock, A.A., Gregersen, R., Fenger, C., Nielsen, H.H., Haugaard, L.S., Wrenfeldt, M., Nielsen, M., Dagnaes-Hansen, F., et al., 2009. Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 1319–1330.

Lalancette-Hebert, M., Gowing, G., Simard, A., Weng, Y.C., Kriz, J., 2007. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 2596–2605.

Latimer, C.S., Brewer, L.D., Searcy, J.L., Chen, K.C., Popovic, J., Kraner, S.D., Thibault, O., Blalock, E.M., Landfield, P.W., Porter, N.M., 2014. Vitamin D prevents cognitive decline and enhances hippocampal synaptic function in aging rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E4359–E4366.

Lei, X. G. (2002) In vivo antioxidant role of glutathione peroxidase: evidence from knockout mice. *Methods Enzymol.* 347: 213–225. Lee, E.W., Seo, J., Jeong, M., Lee, S., Song, J., 2012. The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis. *BMB Rep.* 45, 496–508.

Lee SH, Kwan AC, Zhang S, Phoumthipphavong V, Flannery JG, Masmanidis SC, Taniguchi H, Huang ZJ, Zhang F, Boyden ES, Deisseroth K, Dan Y (2012) Activation of specific interneurons improves V1 feature selectivity and visual perception. *Nature* 488:379–383.

Lee, J.H., O’Keefe, J.H., Bell, D., Hensrud, D.D., & Holick, M.F. (2008). Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? *Journal of the American College of Cardiology*, 52(24), 1949–1956.

Lee, J.M., Zipfel, G.J., Choi, D.W., 1999. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature (Suppl)* 399, A7-A14.

Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, Pardo AC, Nodin C, Stahlberg A, Aprico K, Larsson K, Yabe T, Moons L, Fotheringham A, Davies I, Carmeliet P, Schwartz JP, Pekna M, Kubista M, Blomstrand F, Maragakis N, Nilsson M, Pekny M (2008) Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:468–481

Li Y, Chopp M, Jiang N, Zhang ZG, Zaloga C (1995) Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 26:1252–1257

- Li Y, Chopp M, Powers C, Jiang N (1997) Apoptosis and protein expression after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 765: 301–312
- Li Y, Powers C, Jiang N, Chopp M (1998) Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat. *J Neurol Sci* 156:119–132
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, et al. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402: 672–676.
- Lim C, Alexander MP, LaFleche G, Schnyer DM, Verfaellie M (2004) The neurological and cognitive sequelae of cardiac arrest. *Neurology* 63:1774–1778.
- Lima B, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS. S-nitrosylation in cardiovascular signaling. *Circ. Res.* 2010; 106:633–646.
- Lin JH, Lou N, Kang N, Takano T, Hu F, Han X, Xu Q, Lovatt D, Torres A, Willecke K, Yang J, Kang J, Nedergaard M (2008) A central role of connexin 43 in hypoxic preconditioning. *J Neurosci* 28:681–695
- Lin, Y.; Choksi, S.; Shen, H. M.; Yang, Q. F.; Hur, G. M.; Kim, Y. S.; Tran, J. H.; Nedospasov, S. A.; Liu, Z. G. Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. *J. Biol. Chem.* 279:10822–10828; 2004.
- Liu W, Sood R, Chen Q, Sakoglu U, Hendren J, Cetin O, Miyake M, Liu KJ (2008) Normobaric hyperoxia inhibits NADPH oxidase-mediated matrix metalloproteinase-9 induction in cerebral microvessels in experimental stroke. *J Neurochem* 107:1196–205
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-75.
- Lugg, S. T., Howells, P. A., & Thickett, D. R. (2015). Optimal vitamin D supplementation levels for cardiovascular disease protection. *Disease Markers*, 2015, 1–10.

Ma MW, Wang J, Zhang Q, Wang R, Dhandapani KM., Vadlamudi RK, & Brann DW (2017) NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Molecular Neurodegeneration*, 12, 7. <http://doi.org/10.1186/s13024-017-0150-7>

Macdonald, R.L., Stoodley, M., 1998. Pathophysiology of cerebral ischemia. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 38, 1-11.

MacManus JP, Buchan AM, Hill IE, Rasquinha I, Preston E. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neurosci Lett* 1993; 164:89–92.

Macrae IM. Preclinical stroke research—advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia. *Br J Pharmacol.* 2011; 164:1062–1078

Malatesta, P., Hartfuss, E., and Götz, M. (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Dev. Camb. Engl.* 127, 5253–5263.

McCarty JH (2009) Cell adhesion and signaling networks in brain neurovascular units. *Curr Opin Hematol* 16:209–214

McKhann GM, Borowicz LM, Goldsborough MA, Enger C, Selnes OA (1997) Depression and cognitive decline after coronary artery bypass grafting. *Lancet* 349:1282–1284.

Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 2004;5(10):793–807.

Matsushita H., Morishita R., Nata T., Aoki M., H. Nakagami, Y. Taniyama, K. Yamamoto, J. Higaki, K. Yasufumi, T. Ogihara, Hypoxia-induced endothelial apoptosis through nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-mediated bcl-2 suppression: in vivo evidence of the importance of NF-kappaB in endothelial cell regulation, *Circ.Res.* 86 (2000) 974–981.

Mattson, M.P., 1998. Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends Neurosci.* 20, 53-57.

Merkle FT, Tramontin AD, Garcí'a-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(50):17528–17532.

Merke, J., Milde, P., Lewicka, S., Hugel, U., Klaus, G., Mangelsdorf, D.J., et al. (1989). Identification and regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor activity and biosynthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Studies in cultured bovine aortic endothelial cells and human dermal capillaries. *Journal of Clinical Investigation*, 83(6), 1903–1915.

Meyer AH, Katona I, Blatow M, Rozov A, Monyer H. In vivo labelling of parvalbumin-positive interneurons and analysis of electrical coupling in identified neurons. *J Neurosci* 2002;22(16):7055–7064.

Mustacich, D. & Powis, G. Thioredoxin reductase. *Biochem. J.* 346, 1–8 (2000)

Miramar, M. D. et al. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J. Biol. Chem.* 276, 16391–16398 (2001)

Mizushima N (2007) Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21: 2861–2873.

Mizushima, N., Levine, B., 2010. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat. Cell. Biol.* 12, 823-830.

Montero, M., Gonzalez, B., Zimmer, J., 2009. Immunotoxic depletion of microglia in mouse hippocampal slice cultures enhances ischemia-like neurodegeneration. *Brain Res.* 1291, 140–152.

Morest, D.K., and Silver, J. (2003). Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going? *Glia* 43, 6–18.

Murphy E, Steenbergen C. Ion transport and energetics during cell death and protection. *Physiology (Bethesda)*. 2008; 23:115–123

Myer D, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew MV (2006) Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain* 129:2761–2772

Nakka VP, Gusain A, Mehta SL, Raghubir R. Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities. *Mol Neurobiol.* 2008 Feb;37(1):7-38.

Naveilhan, P., Neveu, I., Baudet, C., Ohyama, K.Y., Brachet, P., Wion, D., 1993. Expression of 25(OH) vitamin D3 24-hydroxylase gene in glial cells. *Neuroreport* 5, 255-257.

Naveilhan, P., Neveu, I., Wion, D., Brachet, P., 1996. 1,25-Dihydroxyvitamin D3, an inducer of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Neuroreport* 7, 2171-2175.

N'Diaye EN, Vaissiere C, Gonzalez-Christen J, Grégoire C, Le Cabec V, Maridonneau-Parini I (1997) Expression of NADPH oxidase is induced by all-transretinoic acid but not by phorbolmyristate acetate and 1,25 dihydroxyvitamin D3 in the human promyelocytic cell line NB4. *Leukemia* 11(12):2131-6.

Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26:523–530

Neveu, I., Naveilhan, P., Baudet, C., Brachet, P., Metsis, M., 1994. 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates NT-3, NT-4 but not BDNF mRNA in astrocytes. *Neuroreport* 6, 124-126

Nishimura, A., Ago, T., Kuroda, J., Arimura, K., Tachibana, M., Nakamura, K., ... Kitazono, T. (2016). Detrimental role of pericyte Nox4 in the acute phase of brain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 36(6), 1143–1154. <http://doi.org/10.1177/0271678X15606456>

Nitatori T, Sato N, Waguri S, et al. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 1995; 15:1001–1011.

Nitsch C, Scotti A, Sommacal A, Kalt G. GABAergic hippocampal neurons resistant to ischemia-induced neuronal death contain the Ca²⁺-binding protein parvalbumin. *Neurosci Lett* 1989;105 (3):263–268.

Nunoi H, Rotrosen D, Gallin JI, Malech HL. Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. *Science* 242: 1298–1301, 1988.

Ogata K, Kosaka T (2002) Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 113:221–233

Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST (2006) A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* 26:13007–13016

Okada S, Nakamura M, Katoh H, Miyao T, Shimazaki T, Ishii K, Yamane J, Yoshimura A, Iwamoto Y, Toyama Y, Okano H(2006) Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nature Med* 12:829–834

Ong SB, Gustafsson AB. New roles for mitochondria in cell death in the reperfused myocardium. *Cardiovasc. Res.* 2012; 94:190–196.

Pattingre S, Tassa A, Qu XP, Garuti R, Liang XH, et al. (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122: 927–939.

Peters A, Jones EG, editors. *Cerebral Cortex, Volume 1: Cellular Components of the Cerebral Cortex*. New York: Plenum; 1984.

Peters A, Palay SL, Webster HD (1991) *The fine structure of the nervous system*, Third edn. Oxford University Press, New York

Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:t421–t431

Pilz S, Tomaschitz A, März W, Drechsler C, Ritz E, Zittermann A, Cavalier E, Pieber TR, Lappe JM, Grant WB, Holick MF, Dekker JM. Vitamin D, cardiovascular disease and mortality. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011 Nov;75(5):575-84. doi: 10.1111/j.1365-2265.2011.04147.x

Pilz S, Tomaschitz A, Drechsler C, Zittermann A, Dekker JM, Marz W (2011) Vitamin D3 supplementation: a promising approach for the prevention and treatment of strokes. *Curr Drug Targets* 12:88–961.

Polster, B.M., 2013. AIF, reactive oxygen species, and neurodegeneration: A „complex“ problem. *Neurochemistry International* 62, 695–702.

Powell EM, Geller HM (1999) Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension. *Glia* 26:73–83

Preta G. Understanding the Dr. Jekyll and Mr. Hyde nature of apoptosis-inducing factor: future perspectives. *Biomed J*. 2017 Aug;40(4):239-240. doi: 10.1016/j.bj.2017.06.004. Epub 2017

Provvedini, D.M., Tsoukas, C.D., Defetos, L. J., & Manolagas, S.C. (1983). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science*, 221(4616), 1181–1183.

Radermacher, K.A.; Wingler, K.; Langhauser, F.; Altenhofer, S.; Kleikers, P.; Hermans, J.J.; Hrabe de Angelis, M.; Kleinschnitz, C.; Schmidt, H.H. Neuroprotection after stroke by targeting NOX4 as a source of oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal*. 2013; 18(12):1418-27.

Rami A, Langhagen A, Steiger S (2008) Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death. *Neurobiol Dis* 29: 132–141.

Rao KV, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD (2005) Astrocytes protect neurons from ammonia toxicity. *Neurochem Res* 30:1311–1318

Razzaque MS, Lanske B. Hypervitaminosis D and premature aging: lessons learned from Fgf23 and Klotho mutant mice. *Trends Mol Med*. 2006;12:298- 305.

Rehncrona S, Smith DS, Akesson B, Westerberg E, Siesjö BK. Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺- and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *J Neurochem.* 1980;34:1630–8.

Revelli, A., Massobrio, M., Tesarik, J., 1998. Nongenomic effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3). *Trends Endocrinol. Metab.* 9, 419e427.

Romera, C., Hurtado, O., Botella, S.H., Lizasoain, I., Cárdenas, A., Fernández-Tomé, P., Leza, J.C., Lorenzo, P., Moro, M.A., 2004. In vitro ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-tumor necrosis factor- α pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 1350–1357

Rossi D, Brady JD, Mohr C (2007) Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci* 10:1377–1386

Rossi F, Zatti M. Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclearleucocytes. NADH and NADPH oxidation by thegranules of resting and phagocytizing cells. *Experientia* 20: 21–23, 1964

Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncu RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675–686

Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, NewburgerPE, Baehner RL, Cole FS, Curnutte JT, Orkin SH. Cloning the gene for an inherited human disorder—chronic granulomatous disease—on the basis of its chromosomal location. *Nature* 322: 32–38, 1986.

Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y, Suzuki T, Iida A, Shiraki-Iida T, Kuro-o M, Nabeshima Y, Kurabayashi M, Nagai R. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;276:767-772.

Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning and translational aspects of protective measures. *Am. J. Physiol.* 2011; 301:H1723–H1741.

Sarkar S, Perlstein EO, Imarisio S, Pineau S, Cordenier A, et al. (2007) Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington's disease models. *Nat Chem Biol* 3: 331–338.

Sattler R, Rothstein JD (2006) Regulation and dysregulation of glutamate transporters. *Handb Exp Pharmacol* 175:277–303

Saunders NR, Ek CJ, Habgood MD, Dziegielewska KM (2008) Barriers in the brain: a renaissance? *Trends Neurosci* 31:279–286

Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neunlist M, Bourreille A, Hurst R, Sofroniew MV (2007) Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 132:1344–1358

Schilling, M., Besselmann, M., Leonhard, C., Mueller, M., Ringelstein, E.B., Kiefer, R., 2003. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp. Neurol.* 183, 25–33.

Schiavone S, Neri M, Trabace L, Turillazzi E. The NADPH oxidase NOX2 mediates loss of parvalbumin interneurons in traumatic brain injury: human autaptic immunohistochemical evidence. *Sci Rep.* 2017 Aug 18;7(1):8752.

Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA, Murphy TH (2003) Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci* 23:3394–3406

Shigetomi E, Bowser DN, Sofroniew MV, Khakh BS (2008) Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons. *J Neurosci* 28:6659–6663

Schilling, M., Besselmann, M., Muller, M., Strecker, J.K., Ringelstein, E.B., Kiefer, R., 2005. Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp. Neurol.* 196, 290–297.

Schneider GB, Benis KA, Flay NW, Ireland RA, Popoff SN (1995) Effects of vitamin D binding protein–macrophage activating factor (DBP-MAF) infusion on bone resorption in two osteopetrotic mutations. *Bone* 16:657–662.

Schulze-Osthoff K., Walczak H., Droge W., Krammer P. H. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J. Cell Biol.* 1994; 127:15–20.

Schummers J, Yu H, Sur M. Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science* 2008;320(5883):1638–1643.

Schwaller B, Meyer M, Schiffmann S. 'New' functions for "old" proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum* 2002;1(4):241–258.

Scragg R, Stewart AW, Waayer D, Lawes CMM, Toop L, Sluyter J, Murphy J, Khaw K, Camargo CA. Effect of Monthly High-Dose Vitamin D Supplementation on Cardiovascular Disease in the Vitamin D Assessment Study A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol.* 2017;2(6):608–616. doi:10.1001/jamacardio.2017.0175

Shintani T, Klionsky D (2004) Autophagy in health and disease: A double edged sword. *Science* 306: 990–995.

Smolders, J., Schuurman, K.G., van Strien, M.E., Melief, J., Hendrickx, D., Hol, E.M., van Eden, C., Luchetti, S., Huitinga, I., 2013. Expression of vitamin D receptor and metabolizing enzymes in multiple sclerosis-affected brain tissue. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 72, 91-105.

Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25 (1): 192–205.

- Seifert G, Schilling K, Steinhauser C (2006) Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7:194–206
- Sen, C. K. (2000) Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr. Top. Cell Regul.* 36: 1–30.
- Smith, G.M., and Miller, R.H. (1991). Immature type-1 astrocytes suppress glial scar formation, are motile and interact with blood vessels. *Brain Res.* 543, 111–122.
- Solberg Y, White EL, Keller A. Types and distribution of glutamic acid decarboxylase (GAD)-immunoreactive neurons in mouse motor cortex. *Brain Res* 1988;459(1):168–172.
- Sofroniew MV (2000) Astrocyte failure as a cause of CNS dysfunction. *Mol Psychiatry* 5:230–232
- Sofroniew MV (2005) Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* 5:400–407
- Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32:638–647
- Spach, K.M., Hayes, C.E., 2005. Vitamin D3 confers protection from autoimmune encephalomyelitis only in female mice. *J. Immunol.* 175, 4119e4126.
- Spitz, D.R., Oberley, L.W., 1989. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal. Biochem.* 179, 8–18.
- Springer, J.E., Azbill, R.D., Mark, R.J., Begley, J.G., Waeg, G., Mattson, M.P., 1997. 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, rapidly accumulates following traumatic spinal cord injury and inhibits glutamate uptake. *J. Neurochem.* 68, 2469-2476.
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SW, Barres BA (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131:1164–1178

Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, Maier CM, Chan PH (2004) Neuronal death/ survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx* 1:17–25

Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem* 1978;90:81–9.

Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM (2004) Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med* 4:193–205

Szalay, G., Martinecz, B., Lenart, N., Kornyei, Z., Orsolits, B., Judak, L., Csaszar, E., Fekete, R., West, B.L., Katona, G., et al., 2016. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nat. Commun.* 7, 11499.

Takano T, Oberheim N, Cotrina ML, Nedergaard M (2009) Astrocytes and ischemic injury. *Stroke* 40:S8–12

Talukder MA, Zweier JL, Periasamy M. Targeting calcium transport in ischaemic heart disease. *Cardiovasc. Res.* 2009; 84:345–352

Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T. Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knockin mouse. *J Comp Neurol* 2003;467(1):60–79.

Teahan C, Rowe P, Parker P, Totty N, Segal AW. The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245. *Nature* 327: 720–721, 1987

The Atlas of Heart Disease and Stroke
http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/

Tian F, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Morimoto N, et al. (2010) In vivo imaging of autophagy in a mouse stroke model. *Autophagy* 6: 1107–1114.

Torrey EF, Barci BM, Webster MJ, Bartko JJ, Meador-Woodruff JH, Knable MB (2005) Neurochemical markers for schizophrenia, bipolar disorder, and major depression in postmortem brains. *Biol Psychiatry* 57:252–260.

Townsend, D. M., Tew, K. D. & Tapiero, H. (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.* 57:145–155. Uchiyama Y., Koike M., Shibata M., Sasaki M. Autophagic neuron death. *Methods Enzymol.* 2009; 453:33-51.

Uchiyama Y, Koike M, Shibata M (2008) Autophagic neuron death in neonatal brain ischemia/hypoxia. *Autophagy* 4: 404–408.

Ullian EK, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA (2001) Control of synapse number by glia. *Science* 291:657–661

Vallet P, Charnay Y, Steger K, Ogier-Denis E, Kovari E, Herrmann F, Michel JP, and Szanto I. Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neuroscience* 132: 233–238, 2005.

Vargas MR, Johnson DA, Sirkis DW, Messing A, Johnson JA (2008) Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 28:13574–13581

Verway M, Behr MA, White JH (2010) Vitamin D, NOD2, autophagy and Crohn's disease. *Expert Rev Clin Immunol* 6(4):505–508.

Volpp BD, Nauseef WM, Clark RA. Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science* 242: 1295–1297, 1988.

Voskuhl RR, Peterson RS, Song B, Ao Y, Morales LB, Tiwari-Woodruff S, Sofroniew MV (2009) Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J Neurosci* 29:11511–11522

Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626–640

Wang Y, Gupta A, Toledo-Rodriguez M, Wu CZ, Markram H. Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 2002;12(4):395–410.

Wang JY, Xia Q, Chu KT, Pan J, Sun LN, et al. (2011) Severe global cerebral ischemia-induced programmed necrosis of hippocampal CA1 neurons in rat is prevented by 3-Methyladenine: a widely used inhibitor of autophagy. *J Neuropathol Exp Neurol*, 70:314–322.

Wang JY, Wu JN, Cheng TL, Hoffer BJ, Chen HH, Borlongan CV, Wang Y (2001) Vitamin D3 attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rats. *Brain Res* 904:67-75.

Wang, T.T., Tavera-Mendoza, L.E., Laperriere, D., Libby, E., MacLeod, N.B., Nagai, Y., Bourdeau, V., Konstorum, A., Lallemand, B., Zhang, R., et al., 2005. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol. Endocrinol.* 19, 2685-2695.

Walder CE, Green SP, Darbonne WC, Mathias J, Rae J, Dinauer MC, Curnutte JT, Thomas GR (1997) Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase. *Stroke* 28:2252–2258.

Wen YD, Sheng R, Zhang LS, Han R, Zhang X, et al. (2008) Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy* 4: 762–769.

Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J* 296: 557–561, 1993.

Williams J. R., Little J. B., Shipley W. U. Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA. *Nature* 1974; 252:754–755.

White EL, Peters A. Cortical modules in the posteromedial barrel subfield (Sml) of the mouse. *J Comp Neurol* 1993;334(1):86–96.

Won S, Sayeed I, Peterson BL, Wali B, Kahn JS, Stein DG. Vitamin D prevents hypoxia/reoxygenation-induced blood-brain barrier disruption via vitamin D receptor-mediated NF- κ B signaling pathways. *PLoS One* 2015; 10(3):e0122821.

World statistics 2009. <http://www.who.int/whosis/whostat/2008/es/index.html>

Wu, S., & Sun, J. (2011). Vitamin D, Vitamin D Receptor, and Macroautophagy in Inflammation and Infection. *Discovery Medicine*, 11(59), 325–335.

Xu X, Callaway EM. Laminar specificity of functional input to distinct types of inhibitory cortical neurons. *J Neurosci* 2009;29(1):70–85.

Xu X, Roby KD, Callaway EM. Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. *J Comp Neurol* 2010;518(3):389–404.

Xu X, Roby KD, Callaway EM. Mouse cortical inhibitory neuron type that coexpresses somatostatin and calretinin. *J Comp Neurol* 2006;499(1):144–160.

Yalbuздag SA, Sarifakioglu B, Afsar SI, Celik C, Can A, Yegin T, Senturk B, Guzelant AY. Is 25(OH)D associated with cognitive impairment and functional improvement in stroke? A retrospective clinical study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2015; 24(7):1479-86.

Yan T, Chopp M, Chen J. Experimental animal models and inflammatory cellular changes in cerebral ischemic and hemorrhagic stroke. *Neuroscience Bulletin*. 2015;31(6):717-734. doi:10.1007/s12264-015-1567-z.

Yamamoto N, Kumashiro R. Conversion of vitamin D3 binding protein (group-specific component) to a macrophage activating factor by the stepwise action of betagalactosidase of B cells and sialidase of T cells. *J Immunol* 1993;151:2794–802.

Yang CY, Leung PS, Adamopoulos IE, Gershwin ME. The Implication of Vitamin D and Autoimmunity: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013 Jan

Yang Z, Zhong L, Zhong S, Xian R, Yuan B. Hypoxia induces microglia autophagy and neural inflammation injury in focal cerebral ischemia model. *Exp Mol Pathol*. 2015 Apr;98(2):219-24

Yao T, Ying X, Zhao Y, et al. Vitamin D Receptor Activation Protects Against Myocardial Reperfusion Injury Through Inhibition of Apoptosis and Modulation of Autophagy. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2015;22(8):633-650.

Yorimitsu T, Nair U, Yang ZF, Klionsky D (2006) Endoplasmic Reticulum Stress Triggers Autophagy. *J Biol Chem* 281: 30299–30304.

Yoshioka H, Niizuma K, Katsu M, Okami N, Sakata H, Kim GS, Chan PH (2011a) NADPH oxidase mediates striatal neuronal injury after transient global cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31, 868–880.

Yuan D, Liu C, Hu B. Inactivation of NSF ATPase Leads to Cathepsin B Release After Transient Cerebral Ischemia. *Transl Stroke Res*. 2017 Oct 17

Zador Z, Stiver S, Wang V, Manley GT (2009) Role of aquaporin- 4 in cerebral edema and stroke. *Handb Exp Pharmacol* 190:159–170

Zanatta AP, Brouard V, Gautier C, Goncalves R, Bouraïma-Lelong H, Silva FRMB, Delalande C: Interactions between oestrogen and 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$ signalling and their roles in spermatogenesis and spermatozoa functions. *Basic Clin Androl* DOI:10.1186/s12610-017-0053-z.

Zhang R, Naughton DP. Vitamin D in health and disease: Current perspectives. *Nutrition Journal*. 2010;9:65. doi:10.1186/1475-2891-9-65.

Zhu CG, Liu YX, Wang H, Wang BP, Qu HQ, Wang BL, Zhu M. Active form of vitaminD ameliorates non-alcoholic fatty liver disease by alleviating oxidative stress in a high-fat diet rat model. *Endocr J*. 2017 Jul 28;64(7):663-673. doi:10.1507/endocrj.EJ16-0542

Zhu Y, Stornetta RL, Zhu JJ. Chandelier cells control excessive cortical excitation: characteristics of whisker-evoked synaptic responses of layer 2/3 nonpyramidal and pyramidal neurons. *J Neurosci* 2004;24(22):5101–5108

Zhu C, Qiu L, Wang X et al. Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J. Neurochem* 2003; 86: 306–17

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Milica D. Velimirović je rođena 26.06.1986. godine u Podgorici. U Beogradu je završila osnovnu školu i Treću beogradsku gimnaziju sa odličnim uspehom. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2005. godine, a na istom fakultetu diplomirala je 2011. godine sa prosečnom ocenom 8.96 i stekla zvanje Doktora medicine. Iste godine upisala je doktorske studije iz oblasti Neuronauka na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Na Medicinskom fakultetu u Beogradu je zaposlena u martu 2012. godine u zvanju saradnik u nastavi, a od maja 2014. godine u zvanju asistenta za užu naučnu oblast medicinska i klinička biohemija. Od januara 2014. godine zaposlena je kao istraživač saradnik na projektu broj #175058, “Strukturne i biohemijske karakteristike poremećaja sinaptičke plastičnosti u psihijatrijskim oboljenjima” finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. U septembru 2015. godine diplomirala je na master akademskim studijama, drugog stepena na studijskom programu Javno zdravlje. Bila je mentor na 6 studentskih radova na domaćim kongresima.

Fokus svoje istraživačke i eksperimentalne delatnosti usmerava na izučavanje patogeneze moždane ishemije, iz čega ima publikovan rad u stručnom časopisu, kao i brojne izvode na međunarodnim i domaćim kongresima. Pored moždane ishemije, bavi se ispitivanjem etiopatogeneze šizofrenije, Alchajmerove bolesti i posledicama posttraumatskog stresnog poremećaja. Tokom svoje istraživačke karijere usavršavala se na brojnim radionicama u zemlji i inostranstvu. Autor je 14 radova publikovanih u inostranim časopisima iz oblasti neuronauka. Do sada je izlagala svoje radove na brojnim međunarodnim i domaćim kongresima, kao i konferencijama iz oblasti neuronauka i psihijatrije.

SPISAK SKRAĆENICA

AIF	faktor indukcije apoptoze
Akt	protein kinaza B
ANOVA	analiza varijansi
Atg	geni povezani sa autofagijom
ATP	adenozin trifosfat
Apaf-1	faktor aktivacije proteze apoptoze
Ask1	apoptoza signal regulišuća kinaza 1
Bax	Bcl-2 asocirani protein X
Bcl-2	B-ćelijski limfom 2
BDNF	Neurotrofni moždani faktor
BNIP	Bcl2 intereagujući protein 3
Ca ²⁺	kalcijum
Cas3	kaspaza 3
COMT	katehol O metal transferaza
CRP	C reaktivni protein
DOPAC	3,4-Dihidroksifenilsirćetna kiselina
ER	endoplazmatski retikulum
FADD	Fas asocirani protein sa domenom smrti
GABA	gama aminobuterna kiselina
GAD	glutamate dekarboksilaza
GDNF	neurotrofni faktor porekla glijalnih ćelija
GFAP	glijalni fibrilarni kiseli protein
γGCL	glutamat cistein ligaza
GnRH	gonadotropni oslobađajući hormon
GPx	glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GSH	redukovani glutacion
H ⁺	vodonik
HVA	homovanilinska kiselina
Iba1	Ca ²⁺ -vezujućeg adapterskog proteina

I κ B α	inhibitor κ B
I/R	ishemija/reperfuzija
K ⁺	kalijum
LC3	mikrotubul asocirani protein
MAO A	monoamin oksidaza
MAP kinaza	Mitogeno aktivirana proteinska kinaza
MDA	malondialdehid
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MTP	mitohondrijalna transportna pora
Na ⁺	Natrijum
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat
NeuN	marker neurona
NF- κ B	nuklearni faktor κ B
NGF	nervni faktor rasta
NMDA	N-Metil-D-aspartatska kiselina
NOD2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain 2</i>
NOS	nitrit oksid sintaza
NOX	NADPH oksidaza
NT	neurotrofin
O ₂ ⁻	superoksidni anjon
PDIA3	protein disulfid izomer familija A, član 3
PI3K	fosfatidil inozitol 3 kinaza
PKA	protein kinaza A
PKC	protein kinaza C
PV	parvalbumin pozitivni neuron
p62	nukleoporin p62
ROS	reaktivni kiseonični oblici
RXR	receptor retinoidnog faktora
SERCA	Ca ²⁺ ATPaza sarkoplazmatskog retikuluma
SH	sulfhidrilne grupe
SOC 3	supresora citokinskog signala 3
SOD	superoksid dizmutaza

SR	slobodni radikali
TGF- β	transformišuću faktor rasta beta
TNF- α	factor nekroze tumora alfa
TPH 2	triptofan hidroksilazu 2
TRADD	TNF receptor 1 asocirani protein sa domenom smrti
Trail	TNF-srodni apoptoza-indukujući ligand
VDB	vitamin D vezujući protein
VDR	receptor za vitamin D
VDRE	vitamin D vezujući element
vitD	vitamin D

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Milica Velimirović

broj upisa NN-06/11

Izjavljujem

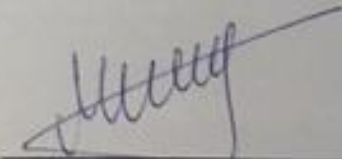
da je doktorska disertacija pod naslovom

Uticaj pretretmana vitaminom D na strukturne i biohemijske promene uzrokovane prolaznom globalnom ishemijom mozga džerbila

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30.04.2018.



Prilog 2.

Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
doktorskog rada**

Ime i prezime autora Milica Velimirović
broj upisa NN-06/11

Studijski program Neuronauke

Naslov rada Uticaj pretretmana vitaminom D na strukturne i biohemijske promene
uzrokovane prolaznom globalnom ishemijom mozga džerbila

Mentor Prof. Dr Nataša Petronijević

Potpisani Milica Velimirović

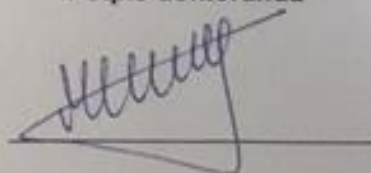
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30.04.2018.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Uticaj pretretmana vitaminom D na strukturne i biohemijske promene uzrokovane prolaznom globalnom ishemijom mozga džerbila

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

U Beogradu, 30.04.2018.

Potpis doktoranda

