

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Stefan P. Stamenković

ISPITIVANJE RANIH MARKERA
PROCESA NEUROINFLAMACIJE I
OKSIDATIVNOG STRESA U MOZGU
TRANSGENOG hSOD1 G93A PACOVA
KAO EKSPERIMENTALNOG MODELA
AMIOTROFIČNE LATERALNE
SKLEROZE

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Stefan P. Stamenković

INVESTIGATION OF EARLY MARKERS
OF NEUROINFLAMMATION AND
OXIDATIVE STRESS IN THE BRAIN OF
THE TRANSGENIC hSOD1 G93A RAT AS
AN EXPERIMENTAL MODEL FOR
AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

Ph.D. Thesis

Belgrade, 2017

Mentor:

Dr Pavle R. Andus, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Miloš Mojović, vanredni profesor Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu

Dr Tanja Dučić, viši naučni saradnik, „*CELLS – ALBA Synchrotron light source*”, Barselona, Španija

Eksperimentalna istraživanja ove doktorske disertacije su urađena u Centru za lasersku mikroskopiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, EPR Laboratoriji Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, Fraunhofer institutu za ćelijsku terapiju i imunologiju u Lajpcigu, Nemačka, ALBA sinhrotronu u Barseloni, Španija, i Paul Scherrer institutu u Viligenu, Švajcarska.

Zahvaljujem se:

Mentoru, dr Pavlu R. Anđusu na ukazanom poverenju i pruženim prilikama za stručno usavršavanje, na pomoći u osmišljavanju eksperimenata i diskusijama rezultata, kao i na pomoći prilikom pisanja radova i izrade ove doktorske disertacije.

Kolegama iz EPR Laboratorije Fakulteta za fizičku hemiju, dr Goranu Bačiću, dr Milošu Mojoviću, dr Ani Popović-Bijelić, dr Marku Dakoviću i Aleksandri Pavićević na izuzetnoj pomoći u osmišljavanju, izvođenju i analiziranju eksperimenata EPR spektroskopije i oslikavanja magnetnom rezonancijom.

Dr Tanji Dučić na pomoći u izvođenju i analiziranju rezultata eksperimenata pomoću mikroskopije Rentgenskim zračenjem niskih energija i fluorescentnim Rentgenskim zračenjem.

Dr Alexander Kranz-u na pomoći u analizi konfokalnih slika IMARIS softverom i korisnim sugestijama tokom eksperimentalnog rada.

Kolegama iz Centra za lasersku mikroskopiju na pomoći, strpljenju, lepim trenucima i svim ostalim malim stvarima koje su mnogo značile

Svim prijateljima i porodici na razumevanju i podršci.

ISPITIVANJE RANIH MARKERA PROCESA NEUROINFLAMACIJE I
OKSIDATIVNOG STRESA U MOZGU TRANSGENOG hSOD1 G93A PACOVA
KAO EKSPERIMENTALNOG MODELA AMIOTROFIČNE LATERALNE
SKLEROZE

REZIME

Amiotrofična lateralna skleroza je smrtonosno neurodegenerativno oboljenje koje pogađa motorne i kognitivne domene centralnog nervnog sistema (CNS). Mutacije u genu za Cu, Zn-supeoksid dismutazu (SOD1) uzrokuju 20% familijalnih slučajeva ALS i izazivaju stvaranje unutarćelijskih SOD1 agregata i smanjeno vezivanje Cu i Zn, što dovodi do patoloških unutarćelijskih promena i neurodegeneracije. Istraživanja na *post mortem* tkivu ALS pacijenata i životinjskim modelima bolesti su istakla glijalnu aktivaciju, poremećenu homeostazu prelaznih metala, oštećenje krvno-moždane barijere (KMB) i povećanu proizvodnju reaktivnih kiseoničnih vrsta kao glavne patološke faktore u bolesti. Cilj ove studije je bio da se ispituju navedene patološke promene u motornim (moždano stablo) i ne-motornim (hipokampus) centrima u mozgu transgenog hSOD1 G93A pacovskog modela ALS, u presimptomatskom i simptomatskom stadijumu bolesti, kako bi se detaljnije proučili ovi patofiziološki mehanizmi i identifikovale rane promene u bolesti.

Prisustvo i vremenski sled aktivacije i morfoloških promena mikroglije i astrocita, kao i akumulacija i distribucija SOD1 proteina u ovim ćelijama su ispitani naprednim 3D modelovanjem i analizom kolokalizacije na slikama dobijenim konfokalnom laserskom skenirajućom mikroskopijom. Rezultati su pokazali glijalnu proliferaciju i progresivno nakupljanje SOD1 u tkivu u oba ispitivana moždana regiona hSOD1 G93A pacova, koji počinju već u presimptomatskoj fazi. U moždanom stablu ovih životinja aktivacija astrocita je bila prisutna pre početka simptoma bolesti, i bila je praćena aktivacijom mikroglije. Takođe, u moždanom stablu astrociti su pokazali progresivnu akumulaciju SOD1 proteina u ćelijskom telu i nastavcima, dok su nivoi SOD1 u mikrogliji bili smanjeni a njena distribucija ograničena na distalne ćelijske nastavke. U hipokampusu hSOD1 G93A pacova astrociti su pokazali isti reaktivni profil kao onaj uočen u moždanom stablu, dok je morfologija mikroglije bila nepromenjena. U ovom regionu mozga oba tipa glijalnih ćelija su pokazala akumulaciju SOD1 proteina u ćelijskom telu. Topografska i kvantitativna analiza elementarnog

sastava tkiva pomoću Rentgenske fluorescentne mikroskopije je pokazala smanjenje u količini P i povećane koncentracije Ca, Cl, K, Ni, Cu i Zn u moždanom stablu, kao i povećane nivoe Cl, Ni i Cu uz smanjenje Zn u hipokampusu simptomatskih hSOD1 G93A pacova.

Redoks status moždanog tkiva i integritet KMB u hSOD1 G93A pacovima su ispitani *in vivo* EPR spektroskopijom korišćenjem 3 aminoksil radikala sa različitim sposobnostima prolaska kroz ćelijsku membranu i KMB, Tempola, 3-karbamoil-proksila (3CP), i 3-karboksi-proksila (3CxP). Rezultai su ukazali da je 3CP najprikladniji za ispitivanje unutarćelijskog redoks statusa, pošto je Tempol bio redukovani *in vivo* u roku od nekoliko minuta što je onemogućilo pouzdano kinetičko modelovanje, dok se 3CxP pokazao neadekvatnim usled slabe sposobnosti prolaska kroz ćelijske membrane. Farmakokinetičko modelovanje redukcije 3CP *in vivo* u glavi presimptomatskih i simptomatskih hSOD1 G93A pacova je ukazalo na izmenjen redoks status moždanog tkiva i moguće oštećenje KMB u ovim životinjama. Izmenjen redoks status u mozgu hSOD1 G93A pacova je potvrđen biohemijskim esejima koji su pokazali povećanu nitrilaciju, proizvodnju superoksidnog radikala, lipidnu peroksidaciju i aktivnost SOD2, kao i smanjenu aktivnost SOD1 u homogenatima tkiva moždanog stabla i hipokampusa ovih životinja. Oštećenje KMB je potvrđeno eksperimentima oslikavanja magnetnom rezonancijom koji su pokazali curenje KMB već kod presimptomatskih životinja, uz dalje širenje oštećenja kod simptomatskih pacova.

Ovi rezultati donose novi uvid u glijalni odgovor i promene u homeostazi različitih elemenata tokom razvoja i progresije bolesti u motornim i ne-motornim strukturama CNS, i ukazuju na poremećen redoks status mozga i oštećenje KMB kao rane markere bolesti.

Ključne reči: amiotrofična lateralna skleroza, moždano stablo, hipokampus, glija, prelazni metali, oksidativni stres, krvno-moždana barijera.

Naučna oblast: Neuronauke

Uža naučna oblast: Neurofiziologija sa biofizikom

UDK broj: [575.22:575.224.2]:616.8-00/-003.99(043.3)

INVESTIGATION OF EARLY MARKERS OF NEUROINFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS IN THE BRAIN OF THE TRANSGENIC hSOD1 G93A RAT AS AN EXPERIMENTAL MODEL FOR AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disorder affecting both the motor and cognitive domains of the central nervous system (CNS). Mutations in the Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1) cause 20% of familial ALS and provoke formation of intracellular SOD1 aggregates and copper and zinc unbinding, leading to pathological intracellular changes and neurodegeneration. *Post mortem* and animal model studies indicate glial activation, perturbed transition metal homeostasis, blood-brain barrier (BBB) disruption and elevated production of reactive oxygen species as major contributors to disease pathology. The aim of this study was to investigate the above mentioned pathological changes in motor (brainstem) and non-motor (hippocampus) brain centers of a transgenic hSOD1 G93A rat model of ALS, in presymptomatic and symptomatic stages of the disease, in order to further clarify these pathophysiological mechanisms and to identify early changes in the disease.

The presence and the timeline of activation and morphological changes of microglia and astrocytes, as well as their intracellular accumulation and distribution of SOD1 were investigated by advanced 3D modeling and colocalization analysis of images obtained by confocal laser scanning microscopy. Results revealed glial proliferation and progressive tissue accumulation of SOD1 in both brain regions of hSOD1 G93A rats starting already at the presymptomatic stage. In the brainstem of these animals astrocytes activation occurred before disease symptoms onset, and was followed by activation of microglia. Additionally, in the brainstem astrocytes demonstrated progressive SOD1 accumulation in the cell body and processes, while microglial SOD1 levels were reduced and its distribution limited to distal cell processes. In the hippocampus of hSOD1 G93A rats astrocytes exhibited an identical reactive profile as the one observed in the brainstem, while microglial morphology was unchanged. In this brain region both glial cell types exhibited SOD1 accumulation in the cell body. Topographic and quantitative analysis of the tissue elemental composition by X-ray fluorescence imaging revealed decreased P and increased Ca, Cl, K, Ni, Cu and

Zn in the brainstem, and higher levels of Cl, Ni and Cu, but lower levels of Zn in the hippocampus of symptomatic hSOD1 G93A rats.

The brain tissue redox status and BBB permeability in hSOD1 G93A rats were investigated by *in vivo* EPR spectroscopy using three aminoxyl radicals with different cell membrane and BBB permeabilities, Tempol, 3-carbamoyl proxyl (3CP), and 3-carboxy proxyl (3CxP). The EPR results indicated that 3CP is the most suitable for reporting the intracellular redox status changes, as Tempol was reduced *in vivo* within minutes thus preventing reliable kinetic modeling, whereas 3CxP was shown to be inappropriate for these experiments due to its membrane impermeability. Pharmacokinetic modeling of 3CP reduction *in vivo* in the head of presymptomatic and symptomatic hSOD1 G93A rats indicated an altered brain tissue redox status and possible BBB disruption in these animals. Altered brain redox status in hSOD1 G93A rats was confirmed by biochemical assays showing increased nitration, superoxide radical production, lipid peroxidation and SOD2 activity, and a decreased SOD1 activity in brainstem and hippocampus tissue homogenates of these animals. BBB disruption was confirmed by MRI experiments showing presence of BBB breakdown already in presymptomatic animals, with further spreading of BBB damage in symptomatic rats.

These results bring new insights into the glial response and alterations in tissue elemental homeostasis during disease development and progression in motor as well as in non-motor CNS structures, and indicate disturbed brain tissue redox status and BBB disruption as early markers of the disease.

Key words: amyotrophic lateral sclerosis, brainstem, hippocampus, glia, transition metals, oxidative stress, blood-brain barrier.

Scientific filed: Neuroscience

Narrower scientific field: Neurophysiology and Biophysics

UDC number: [575.22:575.224.2]:616.8-00/-003.99(043.3)

Sadržaj:

Uvod	1
<i>Amiotrofična lateralna skleroza</i>	1
<i>Glavni genetički faktori u ALS</i>	1
<i>Mikroglia i njena uloga u patologiji ALS</i>	5
<i>Astrociti i njihova uloga u patologiji ALS</i>	7
<i>Mehanizmi glijalne toksičnosti u ALS</i>	9
<i>Uloga prelaznih metala u patologiji ALS</i>	13
<i>Krvno moždana barijera i njena funkcija u ALS</i>	15
<i>Oksidativni stres u ALS</i>	18
Cilj istraživanja	21
Materijali i metode	22
<i>Eksperimentalne životinje</i>	22
<i>Genotipizacija životinja metodom polimerazne lančane reakcije (PCR)</i>	23
<i>Izolacija i održavanje primarne ćelijske kulture kortikalnih astrocita</i>	24
<i>Imunohistohemija</i>	27
<i>Priprema tkiva</i>	27
<i>Imunofluorescentno obeležavanje moždanih preseka</i>	28
<i>Konfokalna mikroskopija</i>	29
<i>Analiza konfokalnih snimaka</i>	30
<i>Određivanje čistoće primarne kulture astrocita i ekspresije SOD1 proteina u astrocitima in vitro primenom imunocitohemijske metode</i>	32
<i>Ispitivanje proizvodnje superoksidnog radikala astrocita u kulturi pomoću MitoSox Red indikatora</i>	34
<i>Ispitivanje unutarćelijske strukture astrocita u kulturi pomoću mikroskopije Rentgenskim zračenjem niskih energija</i>	35
<i>Rentgenska fluorescentna mikroskopija (eng. X-ray fluorescence imaging – XRF)</i>	36
<i>Priprema tkiva</i>	36
<i>Pravljenje XRF snimaka</i>	36

<i>Analiza XRF mapa</i>	37
<i>Biohemijsko ispitivanje parametara oksidativnog stresa</i>	37
<i>Priprema homogenata tkiva</i>	37
<i>Određivanje koncentracije nitrata</i>	38
<i>Određivanje proizvodnje superoksidnog radikala</i>	38
<i>Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze 1 i 2</i>	38
<i>Određivanje indeksa lipidne peroksidacije</i>	39
<i>Elektronska paramagnetna rezonancija</i>	39
<i>In vitro i ex vivo EPR spektroskopija</i>	41
<i>In vivo EPR spektroskopija</i>	41
<i>Kinetičko modelovanje stopa redukcije spinskih proba</i>	43
<i>Oslikavanje magnetnom rezonancijom</i>	44
<i>Statistička analiza</i>	45
Rezultati	46
<i>Ispitivanje histoloških promena u moždanom tkivu</i>	
<i>presimptomatskih i simptomatskih hSOD1 G93A pacova</i>	46
<i>Imunohistohemijska analiza glijalnih markera u</i>	
<i>moždanom stablu i hipokampusu</i>	46
<i>Analiza konfokalnih 3D slika pojedinačnih glijalnih ćelija u facijalnom jedru</i>	51
<i>Analiza konfokalnih 3D slika pojedinačnih glijalnih ćelija u dentatnom girusu</i>	54
<i>Ispitivanje unutarćelijske organizacije i funkcionalnih karakteristika</i>	
<i>astrocita izolovanih iz ALS pacova</i>	57
<i>Potvrda čistoće kulture kortikalnih astrocita</i>	57
<i>Ispitivanje ekspresije SOD1 proteina u astrocitima u kulturi</i>	58
<i>Ispitivanje unutarćelijske strukture astrocita izolovanih iz ALS životinja</i>	59
<i>Ispitivanje proizvodnje superoksidnog radikala u kulturi astrocita</i>	
<i>izolovanih iz ALS životinja</i>	61
<i>Ispitivanje koncentracije hemijskih elementata u tkivu facijalnog jedra</i>	
<i>i dentatnog girusa simptomatskih hSOD1 G93A pacova</i>	62
<i>Ispitivanje parametara oksidativnog stresa u tkivu moždanog stabla</i>	
<i>i hipokampusu presimptomatskih i simptomatskih hSOD1 G93A pacova</i>	65

<i>Ispitivanje redoks statusa i propustljivosti krvno-moždane barijere u mozgu presimptomatskih i simptomatskih hSOD1 G93A pacova in vivo</i>	67
<i>In vitro i ex vivo redukcija nitroksida</i>	67
<i>In vivo farmakokinetika nitroksida u regionu glave pacova</i>	69
<i>MRI ispitivanje propustljivosti krvno-moždane barijere u mozgu presimptomatskih i simptomatskih hSOD1 G93A pacova</i>	75
Diskusija	77
<i>Ćelijske i unutarćelijske promene u mozgu hSOD1 G93A pacova</i>	77
<i>Proliferacija glijalnih ćelija i akumulacija SOD1 proteina u moždanom tkivu hSOD1 G93A pacova</i>	77
<i>Promene u morfologiji glijalnih ćelija i unutarćelijskoj distribuciju SOD1 proteina u hSOD1 G93A pacovima</i>	78
<i>Promene u koncentraciji različitih hemijskih elemenata u tkivu moždanog stabla i hipokampusa simptomatskih hSOD1 G93A pacova</i>	83
<i>Promena redoks statusa i povećanje propustljivosti krvno-moždane barijere u mozgu hSOD1 G93A pacova</i>	86
<i>In vitro i ex vivo redukcija nitroksida</i>	87
<i>In vivo redukcija nitroksida</i>	88
<i>Promena redoks statusa u mozgu hSOD1 G93A pacova</i>	93
Zaključci	97
Literatura	99
Biografija	129

Uvod

Amiotrofična lateralna skleroza

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS), takođe poznata kao Lu Gerigova bolest, je smrtonosno neurodegenerativno oboljenje koje se karakteriše odumiranjem gornjih i donjih motornih neurona kičmene moždine, moždanog stabla i motornog dela kore velikog mozga koji kontrolišu funkciju skeletnih mišića. Bolest je prvi opisao još 1869. godine francuski neurobiolog Jean Martin Charcot. Učestalost pojave bolesti je 2,6 do 3 obolele osobe na 100000 ljudi, pri čemu muškarci imaju 1,2 do 1,5 puta veću šansu za obolevanje u odnosu na žene (van Es et al., 2017). U glavne kliničke simptome bolesti spadaju problemi sa govorom (disartrija), disanjem (dispnea), gutanjem (disfagija), i opšta slabost mišića koja se vremenom razvija u mišićnu atrofiju i paralizu. Glavni uzrok smrti predstavlja otkazivanje mišića odgovornih za disanje koje se dešava u roku od 3 do 5 godina posle pojave prvih simptoma bolesti (Cleveland i Rothstein, 2001; Rowland i Shneider, 2001). Iako je prvobitno opisana kao bolest motornih neurona, ALS je danas prepoznata kao multisistemska oboljenje koje takođe pogađa kognitivne domene. Iako samo mali broj pacijenata koji boluju od ALS takođe razvija frontotemporalnu demenciju (FTD), čak 50% pacijenata ispoljava blaže poremećaje u kogniciji ili ponašanju (Phukan et al., 2012). Takođe, 15 do 20% pacijenata ispoljava probleme u pamćenju, i više studija je otkrilo indikacije oštećenja i degeneracije hipokampalne formacije, prevashodno dentatnog girusa, kod ALS pacijenata (Takeda et al., 2007; Takeda et al., 2009; Brettschneider et al., 2012; Brettschneider et al., 2013).

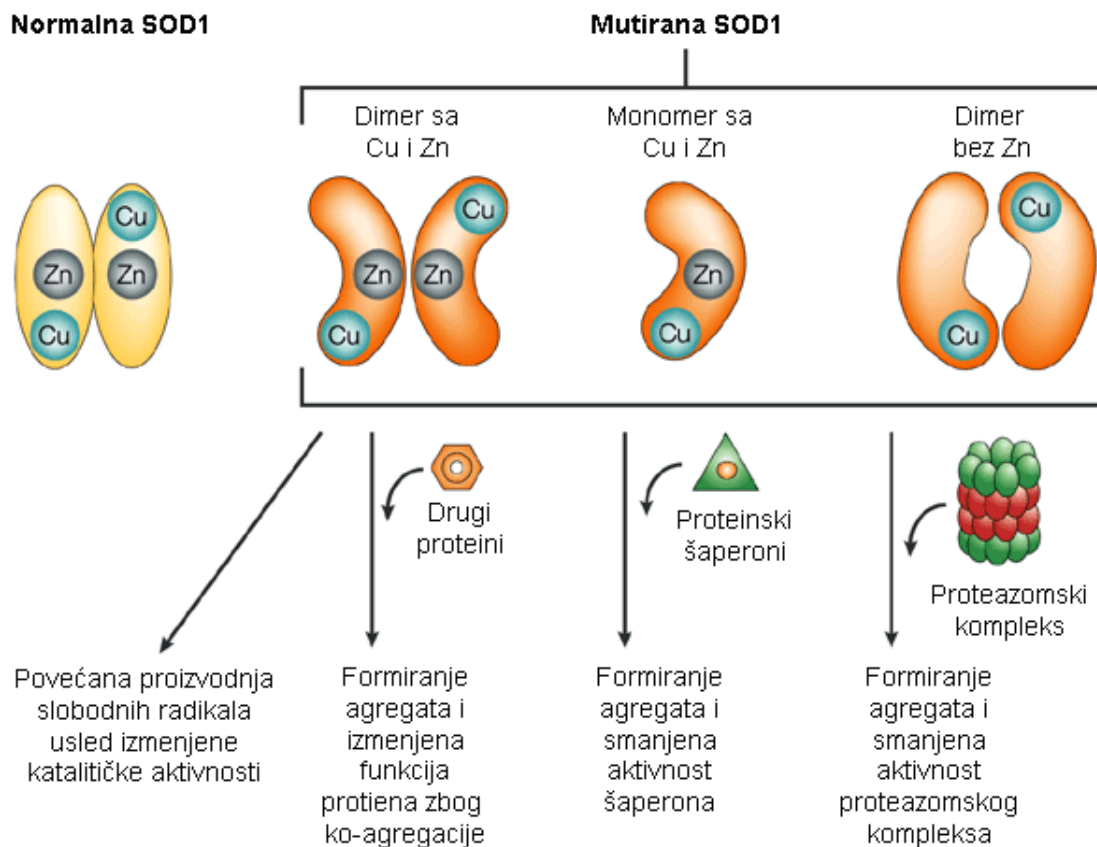
Glavni genetički faktori u ALS

Oko 90% slučajeva ALS je sporadično (sALS), dok je u preostalih 10% slučajeva prisutno familijalno prenošenje bolesti (fALS). Međutim, sALS i fALS ispoljavaju slične fenotipske osobine što onemogućava njihovo kliničko razdvajanje (Robberecht i Philips, 2013). Iako je pokazano da su mutacije u više od 20 gena povezane sa razvojem bolesti, prva otkrivena mutacija u fALS je bila u genu koji kodira za Cu, Zn superoksid dismutazu - SOD1 (Rosen et al., 1993; Chen et al., 2013), tako da

najpoznatije i najistraženije životinjske modele bolesti predstavljaju transgeni mišji i pacovski modeli koji nose veliki broj kopija ljudskog mutiranog SOD1 gena (hSOD1) i koji ispoljavaju patološke promene koje su skoro identične promenama prisutnim kod obolelih ljudi (Gurney et al., 1994; Howland et al., 2002). Opisano je više od 160 mutacija u *sod1* genu koje su povezane sa razvojem bolesti, od kojih većina ispoljava dominantno nasleđivanje, i koje su odgovorne za 20% fALS i 3% sALS slučajeva (Valentine et al., 2005). SOD1 je evolutivno visoko konzerviran antioksidativni homodimerni enzim eksprimiran u citoplazmi i mitohondrijama svih ćelija u organizmu, čija je funkcija da prevodi superoksidni radikal u molekularni kiseonik i vodonik-peroksid (McCord i Fridovich, 1969). Mutacije u SOD1 koje su povezane sa razvojem ALS dovode ili do direktnih promena u strukturi proteina ili do izmenjenog vezivanja jona bakra i cinka koji su neophodni za normalnu interakciju monomera i katalitičku aktivnost enzima. Oba tipa mutacija izazivaju destabilizaciju strukture proteina i povećavaju njegovu sklonost ka oligomerizaciji i formiranju nerastvorljivih proteinskih agregata u neuronima koji predstavljaju specifično patohistološko obeležje bolesti (Shaw i Valentine, 2007).

Jedan od predloženih patoloških mehanizama dejstva mutirane SOD1 podrazumeva da mutirani enzim vrši obrnutu katalizu pri čemu se kiseonik prevodi u superoksidni radikal. Superoksid potom može da reaguje sa azotnim oksidom i da proizvede vrlo reaktivni peroksinitrit koji vrši nitrilaciju proteina što dovodi do njihovog oštećenja (Beckman et al., 1993). Drugi mehanizam podrazumeva Fentonovu reakciju između vodonik-peroksida i redukovano bakra koji ulazi u sastav SOD1 pri čemu dolazi do stvaranja toksičnog hidroksilnog radikala (Rosen et al., 1993). Međutim, kako čak i katalitički neaktivna SOD1 koja za sebe nema vezan bakar može da dovede do pojave bolesti, predloženo je da mutirani SOD1 protein zadobija neko novo toksično svojstvo koje se ogleda u formiranju nerastvorljivih unutarćelijskih agregata ovog proteina. Agregacija SOD1 pored toga što dovodi do smanjenja dismutazne aktivnosti enzima takođe izaziva inhibiciju aksonalnog transporta, stres endoplazmatskog retikuluma, poremećaj proteazomskog sistema i mitohondrijalnu disfunkciju (Soo et al., 2015; Tafuri et al., 2015; Kaur et al., 2016; Parakh i Atkin, 2016), što sve dovodi do smrti neurona (Slika 1). Takođe, toksičnost mutirane SOD1, zajedno sa oštećenjem

neurona, izaziva aktivaciju glijalnih ćelija, astrocita i mikroglije, što dovodi do povećanog otpuštanja proinflamatornih faktora i reaktivnih kiseoničnih vrsta, kao i razvoja neuroinflamacije koja predstavlja jedan od najizrazitijih patofizioloških mehanizama bolesti (Barber i Shaw, 2010; Philips i Rothstein, 2014).



Slika 1. Predloženi mehanizmi toksičnosti mutirane SOD1. Sa jedne strane mutirana SOD1 dovodi do pojave oksidativnog stresa usled povećane proizvodnje slobodno radikalskih vrsta kroz izmenjenu katalitičku aktivnost. Sa druge strane, agregacija mutirane SOD1 dovodi do poremećaja u drugim aspektima fiziologije ćelije usled ko-oagregacije sa drugim proteinima i proteinskim šaperonima, i smanjene aktivnosti proteazomskog kompleksa. Preuzeto i modifikovano iz Cleveland i Rothstein, 2001.

Mutacije u genima koji kodiraju proteine TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43 – TARDBP, *eng.*) i FUS (Fused in Sarcoma, *eng.*) takođe su povezane sa razvojem ALS, s obzirom na to da su nađene kod 4-6% fALS i oko 2% sALS pacijenata (Andersen i Al-Chalabi, 2011). TDP-43/TARDBP i FUS proteini se eksprimiraju u svim ćelijama u organizmu i uključeni su u popravku DNK, regulaciju transporta RNK, procese translacije i iskrajanja RNK, biogeneze mikroRNK i formiranje granula stresa (Ling et al., 2013). Do sada je otkriveno oko 50 mutacija u svakom od ova dva gena, pri

čemu većina mutacija ispoljava dominantno nasleđivanje (Sreedharan et al., 2008; Kwiatkowski et al., 2009). Iako patofiziološki mehanizmi kojim mutacije u TARDBP i FUS genima dovode do neurodegeneracije tek treba u potpunosti da se definišu, jasno je ustanovljeno da se mutirani TDP-43 i FUS proteini redistribuiraju iz jedra u citoplazmu. Ovo dovodi do pojave toksičnih efekata koji uključuju gubitak jedarne funkcije ovih proteina, stvaranje citoplazmatskih proteinskih agregata i formiranje granula stresa (Ling et al., 2013). Ovo rezultuje u disfunkciji ćelijskih organela i proteina (Wils et al., 2010), kao i u izmenjenoj veličini i dinamici granula stresa koje kao posledicu imaju agregaciju RNK vezujućih proteina i supresiju translacije RNK (Vance et al., 2009; Dewey et al., 2011), što sve vodi ka degeneraciji neurona.

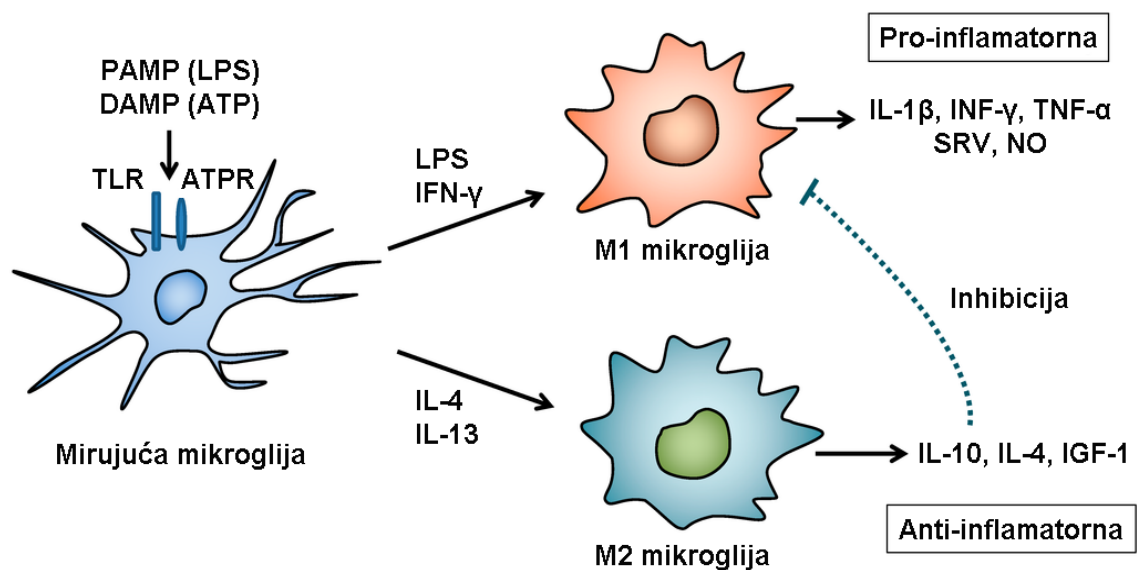
Veliki napredak u razumevanju patogeneze ALS je nastao otkrivanjem mutacija u c9orf72 genu sa dominantnim nasleđivanjem, koje se ogledaju u povećanom broju heksanukleotidnih GGGGCC ponovaka, i koje su odgovorne za čak 40% fALS i do 20% sALS slučajeva (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). Međutim, kako su mutacije u ovom genu identifikovane i kao uzročnik FTD, ovo otkriće je potpuno izmenilo razumevanje patogeneze ALS i ukazalo da je ALS zapravo multisistemsko neurodegenerativno oboljenje, a ne samo nervno-mišićna bolest. Akumulacija TDP-43 proteina, kao i pojava p62 pozitivnih a TDP-43 negativnih unutarćelijskih inkluzija, u neuronima hipokampusa i malog mozga predstavlja glavno neuropatološko obeležje ALS i FTD slučajeva povezanih sa mutacijama u c9orf72, što ukazuje na postojanje zajedničkih patofizioloških mehanizama u ove dve bolesti (Al-Sarraj et al., 2011). Iako tačni mehanizmi kojim ekspanzija ponovaka u c9orf72 genu dovodi do neurodegeneracije u ALS tek treba da budu u potpunosti razjašnjeni, predložena su tri moguća patološka mehanizma koji podrazumevaju haploinsuficijenciju, toksičnost posredovanu ponovcima u RNK i toksičnost usled translacije ponovaka c9orf72 gena koja dovodi do stvaranja nerastvorljivih dipeptida i formiranja unutarćelijskih inkluzija (Ash et al., 2013; Ling et al., 2013). Dodatni potencijalni mehanizam može da bude i toksičnost posredovana RNK, s obzirom na to da je uočeno da unutarjedarna mesta nakupljanja RNK sadrže i heksanukleotidne ponovke c9orf72 gena (DeJesus-Hernandez et al., 2011), kao i da se specifični RNK-

vezujući proteini vezuju za ove heksanukleotidne ponovke što dovodi do formiranja unutarjedarnih i citoplazmatskih inkluzija (Mori et al., 2013).

Mikroglia i njena uloga u patologiji ALS

Mikroglialne ćelije imaju mezodermalno poreklo i predstavljaju glavne imunokompetentne ćelije centralnog nervnog sistema. Mikroglia sintetise i otpušta čitav niz proinflammatoryh i antiinflammatoryh citokina i hemokina u slučaju nastanka oštećenja tkiva nervnog sistema ili prisustva štetnih faktora. Glavnu ulogu u stimulaciji mirujuće mikroglije imaju stimulusi koji se mogu podeliti na molekulske vrste asocirane sa patogenima (PAMP) koji deluju preko „*Toll-like*” receptora (TLR), i molekulske vrste asocirane sa oštećenjem (DAMP) koji deluju preko receptora za ATP (ATPR) (Mosser i Edwards, 2008). Dalja polarizacija aktivirane mikroglije u različite fenotipove zavisi od prisustva proinflammatoryh molekula kao što su lipopolisaharidi (LPS) i interferon γ (IFN- γ), odnosno anti-inflammatoryh citokina kao što su interleukini 4 (IL-4) i 13 (IL-13) (Gordon i Martinez, 2010).

Primarni odgovor tzv. „klasično aktivirane” odnosno M1 mikroglije podrazumeva otpuštanje proinflammatoryh faktora, kao što su faktor nekroze tumora α (TNF- α), interleukin 1β (IL- 1β), IFN- γ , slobodno radikalske vrste (SRV) i azot-monoksid (NO), koji učestvuju u uklanjanju ili ograničavanju oštećenja. Ovo je zatim praćeno otpuštanjem antiinflammatoryh faktora od strane tzv. „alternativno aktivirane” odnosno M2 mikroglije kao što su IL-4, IL-10 i insulinski faktor rasta 1 (IGF-1), koji učestvuju u popravci i oporavku tkiva od nastale štete (Slika 2). Mikroglia nikada ne eksprimira isključivo M1 i M2 citokine, već može da otpusti različite kombinacije citokina i hemokina u zavisnosti od okruženja kojem je izložena i njene interakcije sa drugim ćelijama. Iz tog razloga mikroglialne ćelije mogu da pokazuju različite fenotipove u različitim vremenskim trenucima i regionima CNS. Tako tokom razvoja i progresije inflamatorne reakcije mikroglialne ćelije funkcionišu u bliskoj interakciji sa astrocitima i inflamatornim T ćelijama imunskog sistema koje mogu da stimulišu određeni tip aktivacije mikroglije otpuštanjem odgovarajućih faktora i signalnih molekula (Philips i Rothstein, 2014).



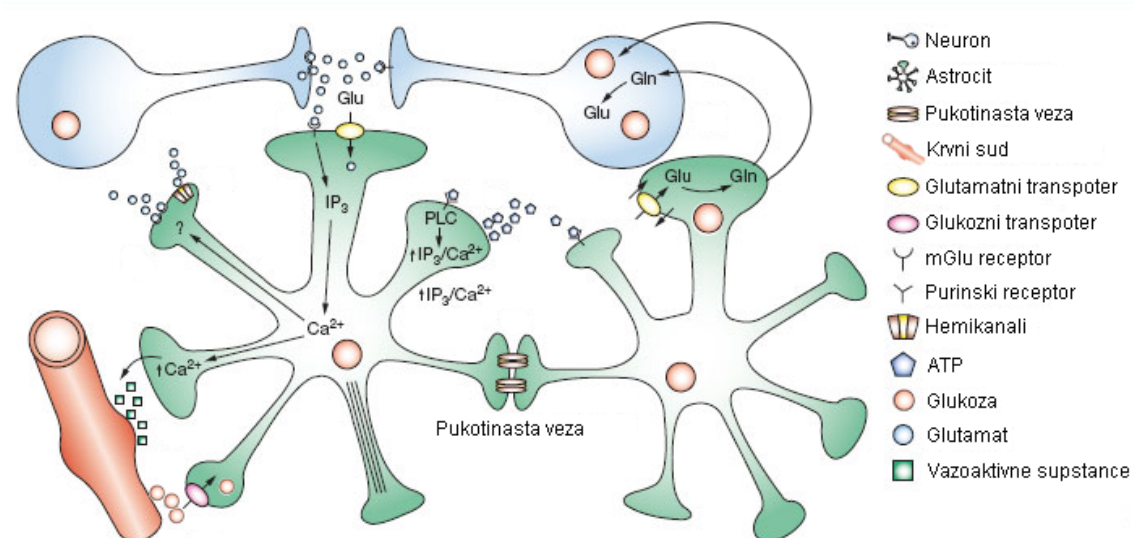
Slika 2. Polarizacija aktivirane mikroglije na M1 i M2 fenotipove i njihove imunoregulatorne uloge. Mirujuće mikroglijalne ćelije mogu biti stimulirane molekularnim obrascima asociranim sa patogenima (PAMP) ili molekularnim obrascima asociranim sa oštećenjem (DAMP). U prisustvu LPS i IFN- γ mikroglija zadobija M1 fenotip i proizvodi pro-inflamatorne posrednike uključujući IL-1 β , INF- γ , TNF- α , slobodno radikalske vrste (SRV) i NO. Nasuprot tome, prisustvo IL-4 i IL-13 izaziva alternativnu aktivaciju mikroglije u M2 fenotip koji dovodi do inhibicije funkcija M1 mikroglije proizvodnjom anti-inflamatornih posrednika kao što su IL-10, IL-4 i IGF-1. Preuzeto i modifikovao Nakagawa i Chiba, 2014.

Kod ALS pacijenata i glodarskih modela bolesti prisutna je jasna mikroglijalna reakcija koja se karakteriše ushodnom regulacijom čitavog niza markera koji služe za identifikaciju ovih ćelija kao što su CD11b i Iba1. Uočava se i povećana ekspresija markera povezanih sa prezentovanjem antigena kao što su CD11c, unutarćelijski adhezioni molekul 1 i CD86, što ukazuje na blisku interakciju mikroglijalnih ćelija sa infiltratima inflamatornih T ćelija koji su takođe prisutni (Alexianu et al., 2001; Henkel et al., 2004; Turner et al., 2004; Henkel et al., 2006; Corcia et al., 2012). Pored toga, pokazano je i da mikroglija povećava proizvodnju proinflamatornih citokina i hemokina (Poloni et al., 2000; Nguyen et al., 2001; Hensley et al., 2003; Meissner et al., 2010). Analiza *post mortem* tkiva ALS pacijenata je pokazala prisustvo mikrogliozе u motornom delu kore velikog mozga, motornim jedrima moždanog stabla, kortikospinalnom traktu i ventralnim rogovima kičmene moždine (Kawamata et al., 1992). U transgenim hSOD1 glodarskim modelima bolesti pokazano je da se mikroglijalna reaktivnost javlja u moždanom stablu i ventralnim rogovima kičmene

moždine neposredno posle denervacije nervno-mišićne sinapse kao prvog patološkog znaka degeneracije motornih neurona (Alexianu et al., 2001; Saxena et al., 2009). Pri tome, smatra se da je ova mikroglialna reakcija posredovana uglavnom lokalnom proliferacijom ćelija iz samog tkiva centralnog nervnog sistema, pre nego infiltracijom i mikroglialnom diferencijacijom mijeloidnih ćelija iz krvotoka (Ajami et al., 2007; Gowing et al., 2008).

Astroцитi i njihova uloga u patologiji ALS

Astroцитi su ćelije ektodermalnog porekla sa bitnim ulogama u regulaciji homeostaze jona, recikliranju neurotransmitera i metaboličkoj podršci neronima u njihovom okruženju (Slika 3). Jedna od najvažnijih i najbolje proučenih funkcija astrocitata je njihova uloga u ciklusu glutamat-glutamin (Danbolt, 2001). Glutamat je jedan od najvažnijih neurotransmitera u centralnom nervnom sistemu koji posreduje u ekscitatornoj sinaptičkoj komunikaciji između neurona. Preuzimanje glutamata iz sinaptičke pukotine, koja se nalazi između presinaptičkog i postsinaptičkog neurona, preko glutamatnih transportera EAAT1 i EAAT2 (ili GLAST i GLT-1 kod glodara) koje ekspimiraju astroцитi služi za sprečavanje prekomerne stimulacije postsinaptičkih glutamatnih receptora koja može da dovede do smrti motornih neurona kroz proces koji se naziva glutamatna ekscitotoksičnost (Van Den Bosch et al., 2006). I zapravo, prvi dokazi o disfunkciji glijalnih ćelija u ALS su proistekli iz studija koje su proučavale ekspresiju glutamatnih transportera na astroцитima kod ALS pacijenata i glodarskih modela ove bolesti. Ove studije su pokazale da astroцитi imaju značajno smanjenu ekspresiju EAAT2 odnosno GLT1 glutamatnog transportera u motornom delu kore velikog mozga i kičmenoj moždini kako kod sporadičnih i familijalnih ALS pacijenata tako i kod glodarskih modela zasnovanih na povećanoj ekspresiji mutirane SOD1 (Rothstein et al., 1992; Bruijn et al., 1997; Howland et al., 2002). Takođe, dodatne *in vitro* i *in vivo* studije su pokazale da specifično ukidanje ekspresije ovog glutamatnog transportera u astroцитima može da izazove degeneraciju motornih neurona i paralizu, sličnu kao kod ALS pacijenata (Rothstein et al., 1996).



Slika 3. Uloga astrocita u ciklusu glutamat-glutamin i metaboličkoj podršci neuronima. Glutamat koji se oslobodi tokom sinaptičke transmisije biva preuzet od strane astrocita preko glutamatnih transportera. U astrocitima glicin sintetaza vrši prevođenje glutamata u glicin. Glicin se potom doprema neuronima u kojima se aktivnošću glutaminaze glicin prevodi u glutamat čime se postiže recikliranje ovog izuzetno važnog neurotransmitera. Sa druge strane, astrociti su u kontaktu sa krvnim sudovima čiji dijametar mogu da regulišu otpuštanjem vazokativnih supstanci kao što su protaglandin, azot monoksid i adenzin. Oni preuzimaju nutritijente, kao što je glukoza, iz krvotoka i putem astrocitne mreže, formirane spajanjem astrocita preko pukotinastih veza, dopremaju nutritijente do neurona koji ih koriste za svoje metaboličke potrebe. Preuzeto i modifikovano iz Maragakis i Rothstein, 2006.

Druga bitna funkcija astrocita je njihova uključenost u metaboličku podršku neuronima. Sa jedne strane, s obzirom na to da ulaze u sastav krvno-moždane barijere, astrociti su u bliskom kontaktu sa krvotokom, dok su sa druge strane međusobno čvrsto povezani preko pukotinastih veza, što im omogućava preuzimanje nutrijenata i metaboličkih substrata i njihov prenos na velike udaljenosti. U uslovima povećane aktivnosti neurona i zahteva za metaboličkim supstratima, astrociti povećavaju njihovu glikolitičku aktivnost uz prevođenje glukoze u laktat (Pellerin i Magistretti, 1994). I glukoza i laktat se preko astrocita i oligodendrocita koji su sa njima spojeni pukotinastim vezama distribuiraju kroz parenhim nervnog tkiva do neurona koji ih koriste kao energentski supstrat (Funfschilling et al., 2012; Lee et al., 2012).

Astrociti se uobičajeno identifikuju preko ekspresije nekoliko proteina specifičnih za ove ćelije uključujući glijalni kiseli fibrilarni protein (GFAP), aldehidnu

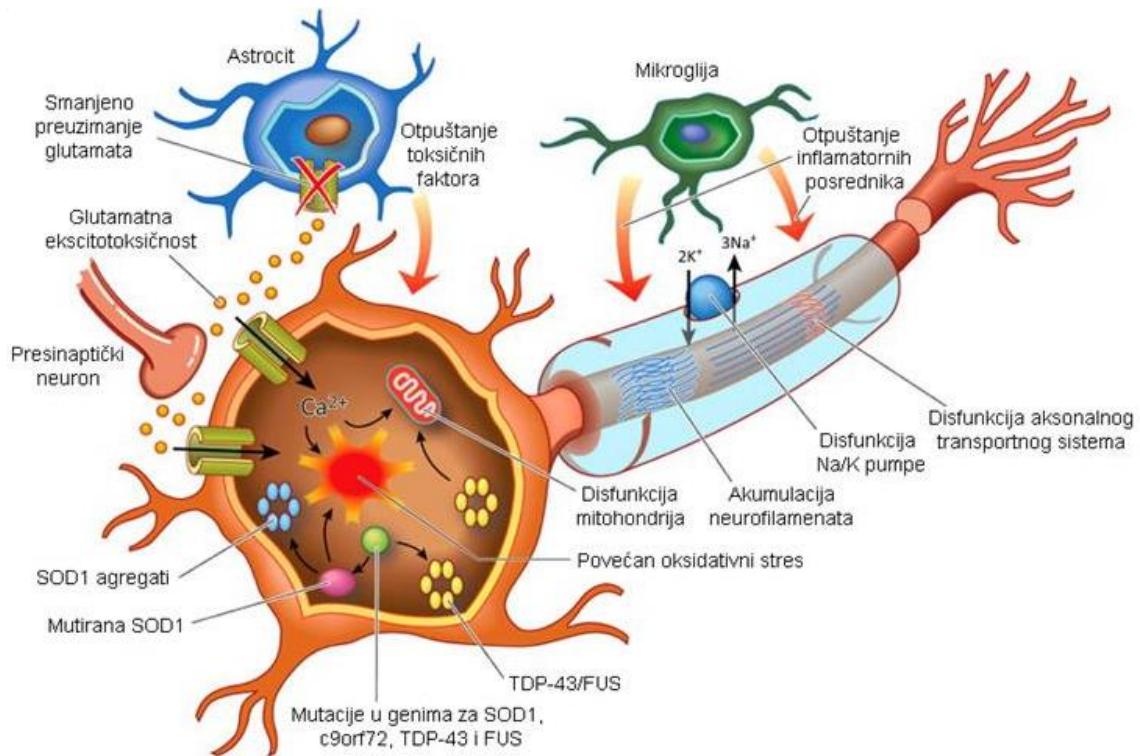
dehidrogenazu 1L1 (ALDH1L1), EAAT1/GLAST, EAAT2/GLT1 i akvaporin 4 (AQP4). U slučaju oštećenje tkiva i ćelija, ili prisustva nekog drugog patološkog faktora u njihovoj neposrednoj blizini, astrociti postaju reaktivni i povećavaju ekspresiju određenih, za njih specifičnih proteina kao što su GFAP i ALDH1L1 kroz proces koji se naziva astroglioza. Sa druge strane, u slučaju oštećenja neurona ove ćelije smanjuju ekspresiju glutamatnog transportera GLT1 (Rothstein et al., 1992; Bruijn et al., 1997; Tawfik et al., 2008). U mozgu ALS pacijenata astroglioza je prisutna i u sivoj i u beloj masi moždanog stabala i motornog dela kore velikog mozga (Kushner et al., 1991; Nagy et al., 1994). U kičmenoj moždini ovih pacijenata astroglioza se javlja u ventralnim i dorzalnim korenovima, kao i u regionima gde vlakna kortikospinalnog trakta ulaze u sivu masu (Schiffer et al., 1996). U glodarskim modelima bolesti astroglioza je pokazana u kičmenoj moždini i moždanom stablu, i odigrava se u naletima, postajući sve izraženija sa napretkom bolesti (Keller et al., 2009). Za razliku od mikroglioze, astroglioza je u manjoj meri posredovana proliferacijom postojećih astrocita, a u većoj meri funkcionalnom aktivacijom ovih ćelija i promenama u ekspresiji njihovih proteina i morfologiji ćelijskih nastavaka, kao i hipertrofijom ćelijskog tela (Bruijn et al., 1997; Gowing et al., 2008; Lepore et al., 2008).

Mehanizmi glijalne toksičnosti u ALS

Značajan doprinos potvrdi koncepta da ne-neuronalne ćelije imaju značajnu ulogu u razvoju ALS je proistekao iz istraživanja na miševima sa himeričnom ekspresijom mutirane SOD1. Kod ovih miševa početak i progresija bolesti su bili pod značajnim uticajem nivoa himerizma za mutiranu SOD1, pri čemu je pokazano da što je veći broj ćelija koje eksprimiraju mutirani protein u odnosu na ukupan broj ćelija to je brži tok bolesti (Clement et al., 2003). Takođe, gubitak motornih neurona koji eksprimiraju mutiranu SOD1 je bio izraženiji ukoliko su oni bili okruženi sa ne-neuronalnim ćelijama koje isto eksprimiraju ovaj protein u poređenju sa normalnim ne-neuronalnim ćelijama. Sa druge strane, i normalni neuroni su ispoljavali znakove oštećenja, kao što je unutarćelijska ubikvitinacija, kada su bili okruženi ne-neuronalnim ćelijama koje eksprimiraju mutiranu SOD1.

Druge studije su pokazale povećanu ekspresiju kako proinflammatory tako i antiinflammatory molekula kod ALS pacijenata i mišjih modela bolesti (Poloni et al., 2000; Nguyen et al., 2001; Hensley et al., 2003; Henkel et al., 2004; Henkel et al., 2006; Meissner et al., 2010). Istovremeno, u mikrogliji dolazi do povećane proizvodnje reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta usled uhodne regulacije NADPH oksidaze i NO sintaze 2, kao i do povećane aktivnosti ciklo-oksigenaze 2 uključene u put sinteze proinflammatory prostanoida (Almer et al., 2001; Beers et al., 2006; Wu et al., 2006). Takođe, *in vitro* studije su pokazale direktnu toksičnost mikroglije izolovane iz mišjih modela bolesti prema motornim neuronima usled povećane proizvodnje proinflammatory molekula i reaktivnih kiseoničnih vrsta (Slika 4) (Weydt et al., 2004; Xiao et al., 2007; Harraz et al., 2008; Meissner et al., 2010). Pretpostavlja se da mikroglija ispoljava svoja neurotoksična svojstva kroz aktivaciju signalnog puta zavisnog od nuklearnog faktora kapa B, s obzirom na to da smanjenje aktivnosti ovog signalnog puta specifično u mikrogliji dovodi do značajnog produženja progresije bolesti i preživljavanja miševa sa mutiranom SOD1 (Frakes et al., 2014).

Astroцити су такође укључени у дегенерацију моторних неурона у ALS (Slika 4), s obzirom na to da je pokazano da su, kao i mikroglija, primarni astroцити izolovani iz mišjih modela bolesti sa mutiranom SOD1 toksični za primarne motorne neurone poreklom od embrionalnih matičnih ćelija (Di Giorgio et al., 2007; Nagai et al., 2007). Interesantno je i to da su astroцити poreklom od matičnih ćelija iz kičmene moždine fALS i sALS pacijenata такође toksični za motorne neurone miša u ko-kulturi (Haidet-Phillips et al., 2011). Iako astroцити nisu po definiciji ćelije imunskog sistema, oni mogu da doprinesu inflamatornom odgovoru. I zapravo, astroцити poreklom od fALS i sALS pacijenata pokazuju ushodnu regulaciju 22 različita faktora komplementa, hemokina i citokina u poređenju sa astroцитима poreklom iz zdravih ljudi (Haidet-Phillips et al., 2011).



Slika 4. Patofiziologija amiotrofične lateralne skleroze. Na slici su sumirani najznačajniji patofiziološki mehanizmi koji leže u osnovi neurodegeneracije u ALS. Ovi mehanizmi su multifaktorijalni i karakterišu se složenom interakcijom između različitih molekularnih i genetičkih puteva. Disfunkcija astrocitnog transportera za glutamat, EAAT2, dovodi do smanjenog preuzimanja glutamata iz sinaptičke pukotine i pojave ekscitotoksičnosti. Ekscitotoksičnost rezultuje u povećanom ulasku jona natrijuma i kalcijuma u ćeliju što dovodi do neurodegeneracije kroz aktivaciju različitih enzimatskih puteva zavisnih od kalcijuma. Ekscitotoksičnost takođe izaziva povećanu proizvodnju slobodno radikalnih vrsta što doprinosi neurodegeneraciji. Mutacije u *c9orf72*, *SOD1*, *TDP-43* i *FUS* rezultuju u poremećenom metabolizmu RNK i proteina što dovodi do stvaranja unutarćelijskih agregata koji su štetni za neurone zbog indukcije oksidativnog stresa, disfunkcije mitochondrija i aksonalnog transporta, kao i akumulacije neurofilamenata. Sa druge strane, aktivacija gljavnih ćelija rezultuje u proizvodnji proinflamatornih i drugih toksičnih faktora, što dodatno doprinosi degeneraciji neurona. Preuzeto i modifikovano iz Vucic et al., 2014.

Iako se može dovesti u pitanje značaj rezultata dobijenih na ko-kulturama astrocita i motornih neurona za *in vivo* patofiziologiju bolesti treba istaći da je pronađena izrazita sličnost između profila ekspresije različitih proteina u *in vitro* ko-kulturama astrocita i motornih neurona i profila ekspresije proteina u kičmenoj moždini miševa sa mutiranom *SOD1* u krajnjem stadijumu bolesti (Phatnani et al., 2013). Međutim, ove studije nisu uspele da identifikuju specifične molekularne ili biohemijske puteve odgovorne za uočenu toksičnost, kao ni da pokažu da li su ovi patološki

mehanizmi prisutni kod ALS pacijenata. Za sada samo gubitak astrocitnog EAAT2 glutamatnog transportera ostaje jedini potvrđeni mehanizam toksičnosti astrocita kod ljudi i glodarskih modela bolesti.

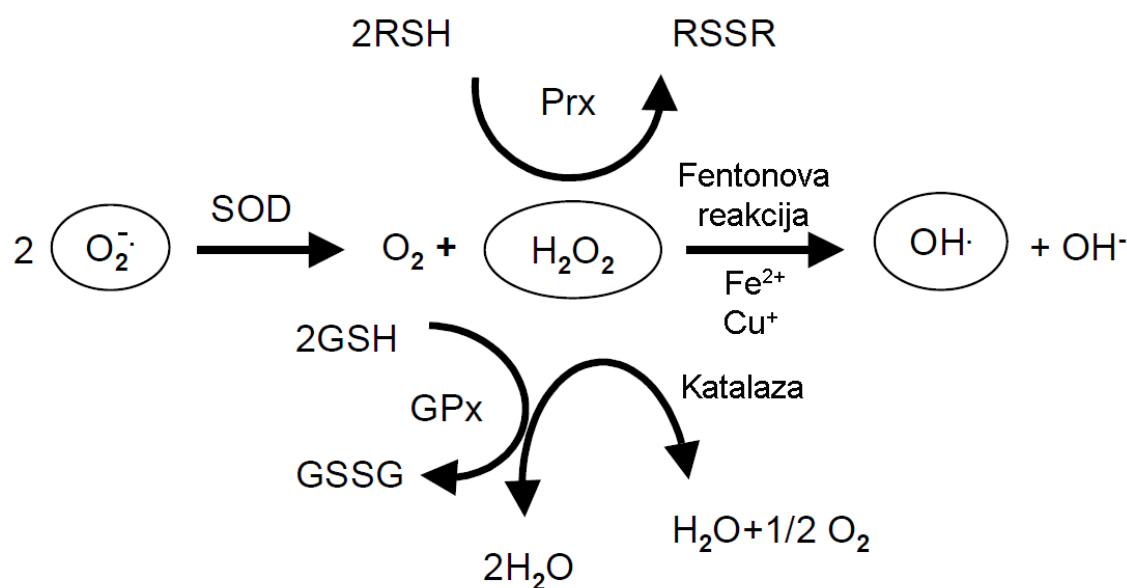
Više studija je pokušalo da istraži da li inhibicija otpuštanja proinflamatornih faktora može da bude korisna kod ALS pacijenata i mišjih modela bolesti sa mutiranom SOD1 (sumirano u Philips i Robberecht, 2011). Generalni zaključak ovih studija, koje su manje ili više specifično ispitivale uticaj određenih inflamatornih citokina i hemokina, jeste da su se terapije sa antiinflamatornim agensima pokazale ili kao krajnje neuspešne ili sa vrlo skromnim uticajem na preživljavanje. Sam efekat ovih terapija je bio jako zavisen od specifične mutacije SOD1 proteina u korišćenom mišjem modelu, prisustva potencijalnih kompenzatornih mehanizama drugih inflamatornih faktora, kao i od nespecifičnog dejstva ovih terapija na druge inflamatorne puteve, a pre svega na antiinflamatorne koji bi mogli da doprinesu povećanom preživljavanju.

Međutim, pored proinflamatornih i toksičnih mehanizama opisanih kod mikroglije i astrocita, nedavne studije su pokazale i bitnu ulogu oligodendrocita u patofiziologiji ALS. Oligodendrociti su ćelije zadužene za formiranje i održavanje mijelinskog omotača koji okružuje aksone neurona i omogućava brzu saltatornu kondukciju akcionih potencijala. Pored toga, ove ćelije pružaju metaboličku podršku neuronima pošto eksprimiraju monokarboksilatni transporter 1 (MCT1) preko kojeg se vrši izbacivanje metaboličkih supstrata, kao što su laktat i ketonska tela, koje potom preko MCT2 preuzimaju neuroni (Rafiki et al., 2003; Lee et al., 2012). U *post mortem* tkivu mozga i kičmene moždine ALS pacijenata pokazano je prisustvo demijelinizacije i oštećenja oligodendrocita (Kang et al., 2013), kao i smanjenje ekspresije MTC1 što ukazuje na smanjenu metaboličku podršku neuronima od strane ovih ćelija (Lee et al., 2012). Oštećenje i degeneracija oligodendrocita koja je prisutna znatno pre gubitka motornih neurona, kao i smanjena ekspresija komponenti mijelinskog omotača i MCT1 od strane ovih ćelija su pokazani i u mišjem modelu bolesti sa hSOD1 G93A mutacijom (Lee et al., 2012; Kang et al., 2013; Philips et al., 2013). Takođe, pokazano je da specifično ukidanje ekspresije mutirane SOD1 isključivo u oligodendrocitima dovodi do značajnog odlaganja u razvoju bolesti i povećanog preživljavanja miševa sa hSOD1 G93A mutacijom, pri čemu se smatra da je ovaj pozitivni efekat makar delom

posredovan sprečavanjem gubitka ekspresije MCT1 (Kang et al., 2013). Svakako, dalja istraživanja su neophodna kako bi se u potpunosti razjasnila uloga ovih ćelija u razvoju i progresiji bolesti.

Uloga prelaznih metala u patologiji ALS

Kao što je već napomenuto, mutacije u SOD1 proteinu koje su povezane sa ALS mogu da utiču na mesta za vezivanje jona bakra i cinka, smanjujući ili u potpunosti ukidajući vezivanje ovih metala za apoprotein, što može da dovede do poremećaja njihove unutarćelijske homeostaze (Seetharaman et al., 2009). Poremećaji u metabolizmu različitih prelaznih metala, kao što su bakar, cink i gvožđe, su opisani u velikom broju neurodegenerativnih oboljenja uključujući ALS (Vonk i Klomp, 2008; Lovejoy i Guillemin, 2014). Povišeni nivoi cinka u centralnom nervnom sistemu mogu da dovedu do povećane glutamatne ekscitotoksičnosti koja rezultuje smrću motornih neurona (Smith i Lee, 2007). S tim u vezi, važno je istaći da je upravo glutamatna ekscitotoksičnost jedan od glavnih patoloških mehanizama prisutnih u ALS, kao i da jedini do sada odobreni lek za terapiju ove bolesti, Riluzol, inhibira otpuštanje glutamata i na taj način smanjuje ekscitotoksičnost. Sa druge strane, redoks-aktivni bakar i gvožđe mogu da učestvuju u Fentonovoj reakciji u kojoj se vodonik-peroksid redukuje u vrlo štetni hidroksilni radikal, što dovodi do povećane proizvodnje reaktivnih kiseoničnih vrsta i oksidativnog stresa (Slika 5) (Jellinger, 2013).



Slika 5. Šematski prikaz stvaranja i uklanjanja slobodno radikalnih vrsta u aerobnim ćelijama. Superoskidni radikal koji se stvara tokom procesa ćelijskog disanja u mitohondrijama se aktivnošću superoksid dismutaze 1 i 2 prevodi u vodonik-peroksid. Vodonik-peroksid se potom redukuje pod uticajem niza anti-oksidativnih enzima kao što su peroksiredoksin, glutation peroksidaza i katalaza. Međutim, u prisustvu slobodnih redoks-aktivnih oblika gvožđa i bakra, vodonik-peroksid se kroz Fentonovu reakciju prevodi u hidroksilni anjon i vrlo reaktivni hidroksilni radikal. GSH – redukovani glutation, GSSG – oksidovani glutation, GPx – glutation peroksidaza, Prx – peroksiredoksin, SOD –superoksid dismutaza. Preuzeto i modifikovano iz Carri et al., 2003.

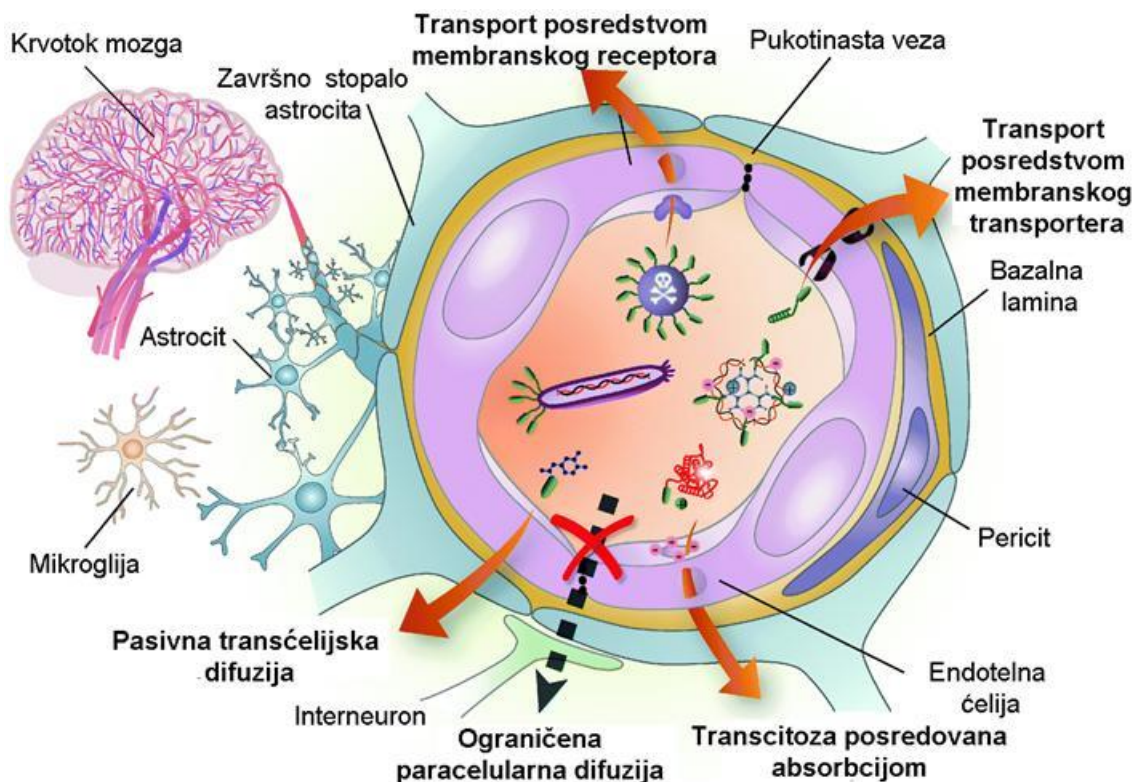
Uloga cinka, bakra i gvožđa u ALS je podržana studijama koje su pokazale povišene nivoe ovih metala u cerebrospinalnoj tečnosti i serumu ALS pacijenata (Hozumi et al., 2011; Roos et al., 2013), kao i povećane koncentracije feritina iz seruma i akumulaciju gvožđa u motornom delu kore velikog mozga (Ikeda et al., 2012; Kwan et al., 2012; Ignjatovic et al., 2013). Povišeni nivoi bakra i cinka su nađeni u beloj masi kičmene moždine transgenih miševa sa različitim mutacijama u SOD1 (Lelie et al., 2011), dok su povišeni nivoi oksidovanih grupacija gvožđe-sumpor, koje mogu da budu izvor slabo vezanog redoks-aktivnog gvožđa, pronađeni u kičmenoj moždini, moždanom stablu, hipokampusu i kori velikog mozga hSOD1 G93A pacova (Popovic-Bijelic et al., 2016). Takođe, tretman sa različitim helatorima za bakar, cink i gvožđe (Petri et al., 2007; Tokuda et al., 2008; Wang et al., 2011), kao i povišena ekspresija unutarćelijskog proteina koji vezuje metale, metalotioneina (Tokuda et al., 2014), su

doveli do produženog preživljavanja transgenih hSOD1 G93A miševa, što naglašava važnost ovih metala u patofiziologiji bolesti.

Krvno moždana barijera i njena funkcija u ALS

Krvno-moždana barijera (KMB) i krvno-kičmeno moždinska barijera (KKMB) su specijalizovane strukture koje kontrolišu razmenu molekula između krvi i tkiva mozga odnosno kičmene moždine, sa ključnom ulogom u održavanju homeostaze centralnog nervnog sistema i zaštiti od štetnih supstanci iz krvotoka (Ballabh et al., 2004; Abbott et al., 2006). Strukturu KMB i KKMB čine endotelne ćelije krvnih sudova mozga, bazalna lamina, periciti i završna stopala astrocita. Endotelne ćelije su međusobno povezane jakim pukotinastim vezama u čiji sastav ulaze transmembranski proteini kludin, okludin i adhezivni molekul pukotinaste veze, kao i pomoćni citoplazmatski proteini kao što su zonula okludens protein 1, cingulin, i drugi. Prisustvo pukotinastih veza sprečava nekontrolisan prolazak hidrofilnih i velikih molekula kroz paracelularni prostor između endotelnih ćelija, dok mali lipofilni molekuli i gasovi, kao što su etanol, kiseonik i ugljen dioksid, mogu slobodno da prolaze kroz lipidne membrane. Nutrijenti i drugi molekuli neophodni za funkcionisanje nervnog sistema ulaze u mozak ili aktivnim transportom preko specifičnih membranskih transportera, kao što je slučaj sa glukozom i aminokiselinama, ili putem endocitoze uz učešće odgovarajućih membranskih receptora, kao što je slučaj sa insulinom, leptinom itd. (Slika 6) (Pardridge et al., 1985; Zhang i Pardridge, 2001).

Sa druge strane, KMB ograničava razmenu tečnosti i jona između krvi i moždanog tkiva, što omogućava preciznu regulaciju transporta vode i jona posredstvom specifičnih jonskih kanala i transportera, i štiti moždano tkivo od velikih fluktuacija jonskog sastava koje bi mogle da poremete nadražljivost neurona i sinaptičku transmisiju. Takođe, postojanje KMB omogućava razdvajanje neurotransmitera i drugih neuroaktivnih agenasa koji deluju centralno u nervnom sistemu od onih koji deluju u perifernim tkivima i krvi, tako da slični agensi mogu da budu iskorišćeni u ova dva sistema bez postojanja rizika za međusobnu interakciju i nespecifične efekte (Abbott et al., 2006).



Slika 6. Šematski prikaz strukture krvno-moždane barijere sa naznačenim mehanizmima transporta različitih supstanci iz krvotoka. Osnovnu strukturu KMB čine endotelne ćelije čvrsto spojene preko pukotinastih veza, koje okružuju bazalna lamina i drugi ćelijski elementi kao što su periciti, završna stopala astrocita, ali i blisko postavljeni neuroni i mikroglia. Čvrsta struktura KMB omogućava efikasnu kontrolu razmene molekula, vode i jona između krvi i mozga, pri čemu je ulazak velikih i hidrofilnih molekula moguć isključivo posredstvom specifičnih membranskih transportnih sistema, dok jedino mali lipofilni molekuli i gasovi mogu slobodno da prolaze pasivnom transćelijskom difuzijom. Preuzeto i modifikovano iz Oller-Salvia et al., 2016.

Iako su u normalnim fiziološkim uslovima KMB i KKMB izuzetno stabilne strukture, njihove karakteristike su ipak podložne promenama koje mogu biti izazvane različitim patološkim stanjima (Abbott, 2005). Veliki broj različitih agenasa koji se mogu naći u cirkulaciji ili biti izlučeni od strane ćelija uključenih u strukturu KMB i KKMB mogu da dovedu do slabljenja pukotinastih veza i povećanja propustljivosti endotelnog sloja, kao i da poremete transportne i metaboličke funkcije ovih barijera. Tako na primer, različiti proinflatorni medijatori kao što su bradikinin, histamin, arahidonska kiselina, prostaglandini, leukotrieni, interelukini i faktor nekroze tumora α , ali i slobodni radikali i azotni oksid, mogu tokom neuroinflatornog odgovora da dovedu do slabljenja KMB i KKMB i njihove povećane propustljivosti (Abbott, 2000). Ovo zatim doprinosi pojavi moždanog edema (Huber et al., 2001), ali i omogućava

ulazak ćelija i drugih komponenti imunskog sistema iz krvotoka u moždano tkivo čime dolazi do pojačavanja neuroinflamatornih procesa.

Mnogobrojne studije su pokazale prisustvo oštećenja KMB i KKMB kako kod ljudi obolelih od ALS tako i kod transgenih glodarskih modela bolesti (Brylev et al., 2012; Alvarez et al., 2013; Garbuzova-Davis i Sanberg, 2014). Prve indikacije oštećenja KMB i KKMB u ALS su podrazumevale povećane nivoe IgG i albumina u cerebrospinalnoj tečnosti (Leonardi et al., 1984; Apostolski et al., 1991), kao i nakupljanje IgG i C3 proteina komplementa imunskog sistema, koje je praćeno pojavom IgG unutar motornih neurona i aktiviranih makrofaga, u kičmenoj moždini i motornom delu kore velikog mozga ALS pacijenata (Donnenfeld et al., 1984; Engelhardt i Appel, 1990). Prisustvo sličnih promena je pokazano i u kičmenoj moždini hSOD1 G93A pacovskog modela bolesti, čak i pre pojave prvih simptoma bolesti (Woodruff et al., 2008). Dodatne histološke studije na moždanom stablu i kičmenoj moždini glodarskih hSOD1 G93A modela su pokazale degeneraciju komponenti KMB i KKMB kao i propuštanje malih krvnih sudova (Garbuzova-Davis et al., 2007; Garbuzova-Davis et al., 2007; Miyazaki et al., 2011), povećanu perivaskularnu akumulaciju eritrocita i hemosiderinskih nakupina gvožđa (Nicaise et al., 2009; Winkler et al., 2013), smanjene protoka krvi i dužine kapilara praćene mikrokrvarenjem i smanjenom ekspresijom nekoliko proteina koji ulaze u sastav pukotinastih veza (Zhong et al., 2008; Henkel et al., 2009), pri čemu je većina ovih promena uočljiva pre početka degeneracije motornih neurona (Zhong et al., 2008; Nicaise et al., 2009; Miyazaki et al., 2011). Još bitnije, pokazano je da je stepen oštećenja neurona kod ovih životinja direktno proporcionalan integritetu KMB i KKMB (Winkler et al., 2014).

Sa druge strane, studije oslikavanja magnetnom rezonancijom (MRI) su pokazale prisustvo žarišta neurodegeneracije u mozgu i kičmenoj moždini (Basak et al., 2002; Zang et al., 2004; Niessen et al., 2006; Bucher et al., 2007), kao i nakupljanje gvožđa u moždanom tkivu (Ignjatovic et al., 2013), kako kod ALS pacijenata tako i kod glodarskih modela bolesti. Međutim, MRI eksperimenti koji su se bavili ispitivanjem stanja KMB su pokazali dvosmislene rezultate. Naime, dok su eksperimenti na hSOD1 G93A pacovima pokazali povećanu propustljivost KMB i izrazito proširenje lateralnih

moždanih komora (Andjus et al., 2009; Bataveljic et al., 2009), eksperimenti na hSOD1 G93A miševima nisu pronašli promene u propustljivosti krvnih sudova ni u jednom stadijumu bolesti (Evans et al., 2014), iako su slične histopatološke promene uočene u oba životinjska modela.

Od posebnog značaja za patologiju ALS je i uloga astrocita u održavanju strukture i funkcije KMB. Naime, *in vitro* studije su pokazale da je prisustvo astrocita neophodno za indukciju mnogih karakteristika KMB, kao što su pravilna asocijacija endotelskih ćelija i pericita, jačanje pukotinastih veza, ekspresija i polarizovana lokalizacija različitih membranskih transportera, kao i ekspresija specijalizovanih enzimskih sistema (Dehouck et al., 1990; Rubin et al., 1991; Ramsauer et al., 2002). Sa druge strane, perivaskularna završna stopala astrocita se karakterišu velikom gustinom membranskih kanala za transport vode, akvaporina 4 (AQP4), i kalijumovih jona, Kir4.1, koji imaju važnu ulogu u regulaciji jonske i osmotske homeostaze CNS. U ovom pogledu, bitno je napomenuti da su povećana ekspresija AQP4 i smanjena ekspresija Kir4.1 pokazane u moždanom stablu i motornom delu kore velikog mozga simptomatskih hSOD1 G93A pacova, kao i u astrocitima izolovanim iz ovih životinja (Bataveljic et al., 2012). Ovo je ukazalo na smanjenu sposobnost astrocita da regulišu homeostazu vode i jona, što može da dovede do poremećaja u funkciji KMB i homeostaze nervnog tkiva, kao i degeneracije neurona u ALS.

Oksidativni stres u ALS

Oštećenje KMB i KKMB dovodi do poremećaja u homeostazi centralnog nervnog sistema, što kao rezultat ima aktivaciju glijalnih ćelija i razvoj procesa neuroinflamacije koji se karakteriše povećanom proizvodnjom proinflamatornih signalnih molekula i reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV), što sve dovodi do neurodegeneracije (Zlokovic, 2008). Sa druge strane, izazivanjem oksidativnih oštećenja i promena u pukotinastim vezama, povećana proizvodnja reaktivnih kiseoničnih vrsta može da dovede do poremećene funkcije KMB (Pun et al., 2009). Promena redoks statusa tkiva označena kao oksidativni stres nastaje usled poremećaja u ravnoteži između proizvodnje RKV i sposobnosti sistema da ih ukloni ili popravi štetu

nastalu njihovim delovanjem. U ćeliji RKV nastaju kao sporedni proizvod aerobnog metabolizma (Coyle i Puttfarcken, 1993; Lenaz, 1998), najviše usled curenja elektrona iz mitohondrijalnog respiratornog lanca, što rezultuje u nepotpunoj redukciji molekula kiseonika tokom oksidativne fosforilacije i nastanku superoksidnog radikala i vodonik-peroksida. Pored toga, RKV u manjoj meri nastaju i usled aktivnosti drugih ćelijskih oksidativnih enzima kao što su ksantin oksidaza u citoplazmi i sistem citohroma P450 u endoplazmatičnom retikulumu. Slobodni radikali kao što su superoksid i azotni oksid se takođe proizvode kao sekundarni glasnici, pogotovu u ćelijama imunskog sistema. Međutim, ni superoksid ni vodonik-peroksid nisu visoko reaktivni, ali oba mogu da budu uključeni u dalje reakcije u kojima nastaju jači oksidanti. Superoksid može da reaguje sa azotnim oksidom pri čemu se stvara peroksinitrit (Pryor i Squadrito, 1995; Beckman i Koppenol, 1996), dok od vodonik-peroksida može da nastane hidroksilni anjon u Fentonovoj reakciji katalizovanoj redukovanim jonima metala kao što su Fe^{2+} i Cu^+ (v. gore i Sliku 5). I peroksinitrit i hidroksilni anjon su vrlo reaktivne oksidujuće vrste koje mogu da oštete proteine, lipide i DNK. Ovakva oštećenja podrazumevaju promene u konformaciji proteina, poremećaje u dinamici ćelijskih membrana usled oksidacije nezasićenih masnih kiselina, kao i oksidativne promene u DNK i RNK.

Brojna istraživanja pokazuju da slobodni radikali i oksidativni stres igraju bitnu ulogu u razvoju i progresiji ALS (Barber i Shaw, 2010). Studije koje su pratile markere oksidativnog stresa u *post mortem* tkivu ALS pacijenata su pokazale povećane nivoe karbonilacije proteina u kičmenoj moždini (Shaw et al., 1995) i motornom delu kore velikog mozga (Ferrante et al., 1997) sALS pacijenata. Takođe, povećani nivoi 3-nitrotirozina, markera oksidativnog oštećenja uzrokovanog peroksinitritom, su nađeni u motornim neuronima kičmene moždine fALS i sALS pacijenata (Abe et al., 1995; Beal et al., 1997). Pored toga, u motornim neuronima ALS pacijenata su pokazani i povećani nivoi ekspresije enzima sintaze azotnog oksida (Abe et al., 1997), što je ukazalo na prisustvo povećane proizvodnje reaktivnih azotnih vrsta. Prisustvo lipidne oksidacije je pokazano u kičmenoj moždini sALS pacijenata (Shibata et al., 2001), dok su nivoi 8-hidroksi-2-deoksiguanozina (8-OHdG), markera oksidovane DNK, bili povišeni u cervikalnom delu kičmene moždine i to najviše u ventralnim rogovima (Fitzmaurice et al., 1996; Ferrante et al., 1997). Studije koje su analizirale cerebrospinalnu tečnost, kako

bi se markeri oksidativnog stresa pratili u ranijem stadijumu bolesti, su pokazale povišene nivoe 8-OHdG (Bogdanov et al., 2000; Ihara et al., 2005), 4-hidroksinonenala (markera lipidne peroksidacije) (Smith et al., 1998; Simpson et al., 2004), i askorbil radikala (Ihara et al., 2005) u uzorcima ALS pacijenata.

Dokazi o oksidativnom stresu su pokazani i u životinjskim modelima bolesti. Povećano oksidativno oštećenje DNK (Warita et al., 2001; Aguirre et al., 2005) kao i karbonilacija proteina (Hensley et al., 2002) su pokazani u kičmenoj moždini hSOD1 G93A miševa. Povećana proizvodnja superoksidnog i hidroksilnog radikala je pokazana u istom mišjem modelu bolesti (Bogdanov et al., 1998; Liu et al., 1999), pri čemu je nivo njihove proizvodnje progresivno rastao sa razvojem bolesti (Hall et al., 1998). Takođe, povećana lipidna peroksidacija je uočena u mozgu, skeletnim mišićima i jetri u transgenim ALS miševima (Miana-Mena et al., 2011).

Cilj istraživanja

Iako je veliki broj različitih patofizioloških mehanizama opisan u razvoju i progresiji ALS, tačan vremenski sled, uzročno-posledične veze, kao i značaj pojedinačnih mehanizama u bolesti nisu u potpunosti razjašnjeni. Iz tog razloga glavni cilj ovog istraživanja je da se detaljnije ispituju prisustvo, karakteristike i vremenski sled glavnih patoloških promena, procesa neuroinflamacije i oksidativnog stresa, u motornim (moždano stablo) i ne-motornim (hipokampus) centrima u mozgu transgenog hSOD1 G93A pacovskog modela ALS, u presimptomatskoj i simptomatskoj fazi bolesti.

Iz glavnog cilja proizašli su sledeći zadaci istraživanja:

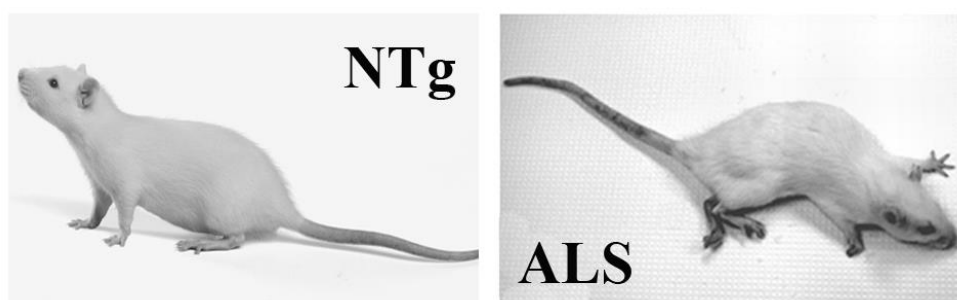
1. Ispitati vremenski sled (presimptomatska vs simptomatska faza) i regionalni profil proliferacije i aktivacije glijalnih ćelija, astrocita i mikroglije, u moždanom tkivu hSOD1 G93A pacova i utvrditi međusobni vremenski sled aktivacije ova dva tipa glijalnih ćelija.
2. Ispitati povezanost promena u unutarćelijskoj akumulaciji i distribuciji mutiranog SOD1 proteina sa aktivacijom i patološkim uticajem glijalnih ćelija.
3. Ispitati promene u homeostazi redoks aktivnih metala i drugih fiziološki relevantnih elemenata u moždanom tkivu hSOD1 G93A pacova.
4. Ispitati prisustvo, kao i vremenski i regionalni profil promena u redoks statusu moždanog tkiva i integriteta krvno-moždane barijere u mozgu hSOD1 G93A pacova.

Dobijeni rezultati treba da pruže nova saznanja o patološkim promenama u mozgu hSOD1 G93A pacova, kao i da pruže uvid u rane markere patogeneze ALS.

Materijali i metode

Eksperimentalne životinje

Eksperimenti su rađeni na transgenim Sprague-Dawley pacovima (002148-T, NTac: SD-Tg (SOD1G93A) L26H) kojima je u genom ubačen veliki broj kopija ljudskog *sod1* gena sa dominantnom tačkastom G93A mutacijom (hSOD1 G93A pacovi Taconic, Hudson, NY, SAD) prvi put opisani od strane Howland et al. (2002), koji razvijaju simptome bolesti motornih neurona nalik ALS. Prvi simptomi bolesti se kod ovih životinja ispoljavaju kao unilateralna slabost i otežano pokretanje jednog od zadnjih ekstremiteta. Posle nekoliko dana nastupa prvo slabost i drugog zadnjeg ekstremiteta, a zatim i potpuna paraliza oba ekstremiteta. Simptomi potom napreduju kao slabost prednjih ekstremiteta uz otežano uzimanje hrane i vode, a krajni stadijum bolesti podrazumeva potpunu paralizu svih ekstremiteta uz nemogućnost uspravljanja i potpunu nepokretnost životinje (Slika 7). Progresija simptoma bolesti je vrlo brza i traje oko 3 nedelje. Održavanje linije transgenih hSOD1 G93A pacova je rađeno ukrštanjem transgenih pacova sa netransgenim pacovima Sprague-Dawley divljeg soja. Kao kontrole u eksperimentima su korišćene netransgene životinje Sprague-Dawley divljeg soja (NTg).



Slika 7. Eksperimentalne životinje. NTg pacov (levo) i ALS pacov u krajnjoj fazi bolesti (desno). Preuzeto i modifikovano iz Howland et al, (2002).

hSOD1 G93A i NTg pacovi su bili poreklom iz istih okota dobijenih ukrštanjem transgenih hSOD1 G93A pacova i Sprague-Dawley pacova divljeg soja, čime je postignuta maksimalna genetička sličnost između životinja korišćenih u eksperimentima i isključena mogućnost doprinosa genetičkih razlika rezultatima istraživanja. Sve

životinje su gajene u ciklusu dan/noć od 12/12h, i imale su pristup hrani i vodi *ad libitum*. Svi eksperimenti su izvedeni u skladu sa standardima za gajenje životinja propisanim od strane Srpskog udruženja za proučavanje laboratorijskih životinja i odobreni su od strane Etičkog komiteta Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. (broj dozvole: EK-BF-2016/03).

Genotipizacija životinja metodom polimerazne lančane reakcije (PCR)

Provera prisustva hSOD1 G93A transgena u životinjama dobijenim iz okota transgenih hSOD1 G93A pacova i Sprague-Dawley pacova divljeg soja je rađena PCR metodom na DNK izolovanoj iz tkiva repa pacova. Od svakog pacova starosti oko 4 nedelje je uzet odsečak repa veličine 0,5 cm i stavljen u 0,3 ml pufera za digestiju (TDB) koji sadrži: 50 mM Tris pufer pH 8,0, 50 mM EDTA i 0,5% natrijum dodecil sulfat. Odsečki su inkubirani u TDB 15 min na +65 °C u cilju inaktivacije enzima koji razgrađuju DNK. Zatim je u svaki uzorak dodato 0,2 ml smeše proteinaze K i TDB u odnosu 187 µl TDB i 13 µl proteinaze K koncentracije 20 mg/ml. Ovako pripremljeni uzorci su inkubirani između 16-18h na +56 °C. Razloženo tkivo je centrifugirano na 14000 x g u trajanju od 5 min. Supernatant je razblažen 20 puta u dejonizovanoj destilovanoj vodi (ddH₂O) i inkubiran 15 min na +95 °C kako bi došlo do razdvajanja lanaca dvolančane DNK.

Svaku PCR smešu su činile sledeće komponente:

- 9,5 µl ddH₂O,
- 12,5 µl PCR Master Mix - smeša nukleotida (0,4 mM po nukleotidu), MgCl₂ (4 mM) i Taq DNK polimeraze (0,05 U/µl) neophodne za otpočinjanje PCR reakcije (Fermentas, Nemačka),
- 1 µl 100µM *SOD1 forward* prajmera, (5'-AGC CCC TGC CTA CCT TTT CCT AAT G-3'),
- 1 µl 100µM *SOD1 reverse* prajmera, (5'-CCA GCT TTA TCG GAT CCA TAA CTT CG-3'),
- 1 µl uzorka izolovane DNK.

Pored uzoraka koje je trebalo ispitati, pripremani su i kontrolni uzorci: pozitivna kontrola - DNK uzorak hSOD1 G93A pacova, negativna kontrola – DNK uzorak NTg pacova, kontrola PCR reakcije - uzorak ddH₂O.

PCR reakcija se odvijala u više ciklusa (Tabela 1).

Tabela 1. Protokol za PCR reakciju.

Naziv faze	Temperatura (°C)	Trajanje (sec)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95	300	1
Denaturacija	95	60	35
Hibridizacija	60	60	
Elongacija	72	120	
Finalna elongacija	72	300	1
Čuvanje	4	Do korišćenja	

Nakon završene PCR reakcije, uzorci su nalivani na 1,7% agarozni gel koji je sadržao etidijum bromid i razdvajani horizontalnom elektroforezom na 100 V u trajanju od 25 min. Gel je osvetljen na transiluminatoru i dokumentovan kamerom.

Transgeni hSOD1 G93A pacovi su korišćeni kao presimptomatske životinje (preALS životinje) sa oko 7 meseci starosti, nakon što dostignu plato telesne mase, ali bez ispoljavanja kliničkih znakova bolesti kao što su otežano pokretanje ili grčenje ekstremiteta. Početak bolesti se najčešće uočavao sa 8 meseci starosti životinje. Simptomatski hSOD1 G93A pacovi („ALS životinje”) su imali otežano kretanje sa atrofijom oba zadnja ekstremiteta i značajnim gubitkom ($20 \pm 5 \%$) telesne mase.

Izolacija i održavanje primarne ćelijske kulture kortikalnih astrocita

Primarne kulture kortikalnih astrocita izolovane su iz frontoparijetalnog dela kore velikog mozga novorođenih pacova starosti dva dana po prethodno opisanom protokolu (McCarthy i de Vellis, 1980) uz određene modifikacije. Pre pristupanja izolaciji pribor za disekciju je sterilisan natapanjem u 70%-om etanolu i izlaganjem

dejstvu ultraljubičastih zraka unutar laminarne komore u trajanju od najmanje 30 minuta. Glava i vrat životinja su dezinfikovani 70%-im etanolom, i potom su životinje žrtvovane dekapitacijom pomoću disekcionih makaza. Glava je odmah prebačena na Petri šolju sa ledom gde je mozak izolovan iz kranijuma i prebačen u Petri šolju sa hladnim sonim rastvorom fosfatnog pufera (PBS) pH 7.4 (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,15 g/l Na₂HPO₄ i 0,2 g/l KH₂PO₄ rastvoreni i ddH₂O). Potom su pod binokularnom lupom prvo od mozga odvojene moždane ovojnice, a zatim su obe hemisfere kore velikog mozga zajedno sa hipokampusom odvojene od ostatka moždanog tkiva. Hipokampus je uklonjen korišćenjem disekcione pincete, a očišćene hemisfere kore velikog mozga su prebačene u epruvetu od 15 ml sa 5 ml hladnog L-15+ medijuma koji je sadržao osnovni Leibovitz L-15 medijum (Gibco, Termo Fisher Scientific, Woltham, SAD), 2 mM L-glutamin, 100 IJ/ml penicilina, 100 µg/ml streptomicina i 0,1% BSA. Epruvete su prebačene u laminarnu komoru za sterilni rad gde je vršeno mehaničko disociranje moždanog tkiva pipetom sa plastičnim nastavkom od 1 ml do dobijanja homogene ćelijske suspenzije. Ćelijska suspenzija je potom centrifugirana 5 min na 500 x g, nakon čega je supernatant odliven a ćelije koje su ostale zalepljene na dno epruvete resuspendovane u 5 ml L-15+ medijuma i opet centrifugirane 5 min na 500 x g. Nakon centrifugiranja supernatant je odliven, a ćelije resuspendovane u 2 ml L-15+ medijuma, prebačene u tubicu od 2 ml i provučene po 3 puta kroz sterilne igle promera 21 i 23 G. Posle poslednjeg provlačenja kroz iglu ćelijska suspenzija je prebačena u epruvetu od 15 ml sa 3 ml L-15+ medijuma i ponovo centrifugirana 5 min na 500 x g. Supernatant je odliven, a ćelije su resuspendovane u 2 ml DMEM+ medijuma zagrejanog na 37 °C koji je sadržao osnovni DMEM medijum (Gibco, Termo Fisher Scientific, Woltham, SAD), 2mM L-glutamin, 100 IJ/ml penicilina, 100 µg/ml streptomicina, 1 mM natrijum piruvat i 10% fetalnog telećeg seruma (eng. fetal bovine serum – FBS). Dobijena suspenzija ćelija je potom dodata u sterilni plastični flask za gajenje ćelija površine 25 cm² sa 3 ml DMEM+ medijuma zagrejanog na 37 °C, koji su potom prebačeni u inkubator. Ćelijske kulture su gajene u *in vitro* uslovima u inkubatoru sa vlažnom atmosferom uz udeo ugljen dioksida od 5% i na temperaturi od 37 °C.

Prva promena medijuma u kojem su ćelije zasejane u flask svežim DMEM+ medijumom je izvršena 48h nakon izolacije, a nakon toga je promena medijuma rađena

na svaka dva dana kako bi se favorizovao rast astrocita u odnosu na ostale tipove glije. Pošto ćelijska kultura izolovana na ovaj način predstavlja mešovitu primarnu kulturu nervnog tkiva u kojoj su najzastupljeniji astrociti, ali koja sadrži i mikrogliju i u manjoj meri oligodendrocite, 5 dana nakon zasejavanja (nakon što je ćelijske kultura dostigla konfluentnost od 70%, odnosno pokrila 70% površine flaska za gajenje) flaskovi su morali da se podvrgnu mehaničkom uklanjanju slabo zalepljene mikroglije trešenjem. Naime, medijum u flaskovima je zamenjen DMEM+ medijumom u koji je bio dodat 25mM HEPES i flaskovi su vraćeni u inkubator na najmanje 2 h. Zatim su poklopci flaskova obmotani parafilmom kako bi se sprečila izmena gasova između flaska i spoljašne sredine, celi flaskovi obmotani aluminijumskom folijom kako bi se sprečila fototoksičnost dodatog HEPES-a, i flaskovi izvađeni iz inkubatora i trešeni 16 – 20 h na orbitalnoj mešalici (Delfia plate shaker 1296-003, PerkinElmer, Waltham, SAD) na 400 rpm na sobnoj temperaturi.

Nakon trešenja ćelije su ispirane 5 puta sa po 5 ml zagrejanog PBS kako bi se uklonili tragovi FBS prisutnog u medijumu, a zatim odlepljivane iz flaskova inkubiranjem u 1 ml rastvora 0,25% tripsina i 0,02% EDTA u PBS 2 min na 37 °C. U flaskove je potom dodavano po 4 ml zagrejanog DMEM+ medijuma kako bi se inaktivirao tripsin, a sadržaj flaska je prebacivan u epruvetu od 15 ml i centrifugiran 5 min na 500 g. Nakon centrifugiranja i odlivanja supernatanta ćelije su resuspendovane u 2 ml zagrejanog DMEM+ medijuma. Po 0,5 ml suspenzije ćelija je prebačeno u nove flaskove za gajenje u koje je prethodno sipano po 4,5 ml zagrejanog DMEM+ medijuma. Ćelije su održavane u novim flaskovima, uz promenu medijuma svaki drugi dan. Nakon dostizanja potpune konfluentnosti ćelije su ponovo odlepljivane po istom postupku i rasejavane za eksperimente u odgovarajućoj gustini. Uzorak suspenzije ćelija je bojen pomoću tripan plavog, a broj živih ćelija (ćelije kod kojih tripan plavo nije ušao u citoplazmu) je određivan pomoću komorice za brojanje (Neubauer). Uobičajen broj živih ćelija je bio 2 – 2,5 miliona ćelija po flasku.

Imunohistohemija

Priprema tkiva

Po 4 NTg, preALS i ALS životinje su anestezirane intraperitonealnom injekcijom mešavine ketamina (0,1 ml / 100 g t.m.; Richter pharma ag, Wels, Austrija) i ksilazina (0,06 ml / 100 g t.m.; Bioveta a.s., Ivanovice na Hane, Češka Republika). Pre izolacije moždanog tkiva, životinjama je urađena transkardijalna perfuzija koja podrazumeva eliminaciju krvi iz tkiva radi sprečavanja nespecifičnog vezivanja antitela, kao i brzu fiksaciju cele životinje radi zaustavljanja procesa proteolize i razvoja bakterija i gljivica čime se očuvava struktura tkiva. Nakon ulaska životinja u duboku anesteziju, što je potvrđeno odsustvom kornealnog refleksa i refleksa povlačenja zadnjih ekstremiteta, životinjama je pažljivo otvaran grudni koš kako bi se oslobodio pristup srcu. Perfuzija je rađena sa 0,01 M sonim rastvorom fosfatnog pufera (PBS) koji sadrži 8,61 g/l NaCl u dvadeset puta razblaženom 0,2 M fosfatnom puferu (PB) pH 7,4 (6,24 g/l NaH₂PO₄ i 22,72 g/l Na₂HPO₄ rastvoreni u ddH₂O) i sa 4% rastvorom paraformaldehida (PFA) u dva puta razblaženom 0,2 M PB pH 7,4. Igla povezana na sistem za perfuziju je uvedena u levu komoru srca, dok je desna pretkomora isečena kako bi se omogućilo isticanje krvi i perfuzionih rastvora iz krvotoka. Kompletna krv iz cirkulatornog sistema pacova je istisnuta sa 200 ml PBS, nakon čega je tkivo fiksirano sa dodatnih 200 ml 4% PFA.

Nakon perfuzije, životinja je dekapitovana i izolovano je moždano tkivo koje je zatim dodatno fiksirano u 4% PFA 48 h na 4 °C. Nakon fiksacije, urađena je dehidracija tkiva u 30% rastvoru saharoze koji je pripremljen u dva puta razblaženom rastvoru 0,2 M PB pH 7,4 kako bi se sprečilo formiranje kristala leda u tkivu prilikom zamrzavanja mozga. Nakon spuštanja mozga na dno posude sa rastvorom saharoze, tkivo je zamrznuto na -80 °C do dalje upotrebe. Mozak je zatim isečen na koronalne preseke debljine 30 µm upotrebom kriostata (CM1850, Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka) na temperaturi od -25°C. Preseci su nanešeni na Superfrost Plus mikroskopske pločice (Manzel-Glasser, Nemačka) i čuvani na +4 °C do dalje upotrebe.

Imunofluorescentno obeležavanje moždanih preseka

Za detekciju i lokalizaciju antigena u moždanim presecima korišćena je metoda indirektno imunofluorescence što podrazumeva upotrebu neobeleženog antitela koje je specifično za ispitivani antigen (primarno antitelo) za koje se zatim vezuje anti-imunoglobulinsko antitelo obeleženo fluorescentnom bojom (sekundarno antitelo). Kompleks antigen-primarno antitelo-sekundarno antitelo-fluorescentna boja fluorescira i može se posmatrati pod mikroskopom nakon ekscitacije fluorescentne boje svetlošću odgovarajuće talasne dužine.

Imunofluorescentno obeležavanje je urađeno na koronalnim presecima iz dva različita regiona mozga sa sledećim koordinatama udaljenosti od Bregme u antero-posteriornoj osi: -11.10 mm (moždano stablo) and -4.45 mm (hipokampus). Koordinate su preuzete iz atlasa koronalnih preseka mozga pacova (Paxinos i Watson, 2006). Pre obeležavanja pločice sa moždanim presecima su izvađene iz frižidera i ostavljene 10 minuta na sobnoj temperaturi. Tkivo je prvo rehidratirano 3 puta po 10 minuta u 0,01 M PBS. Zatim je urađeno blokiranje preseka zarad sprečavanja nespecifičnog vezivanja primarnih i sekundarnih antitela antitela za tkivo u rastvoru 0,01 M PBS koji je sadržao 5% magareći serum, 1% albumin iz telećeg seruma (eng. bovine serum albumin – BSA) i 0,2% Triton X-100 45 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je na preseke nanošen rastvor 0,01 M PBS koji je sadržao jedno ili više odgovarajućih primarnih antitela, 1% magareći serum i 0,02% Triton X-100.

Korišćena su sledeća primarna antitela:

- zečje poliklonalno antitelo na Cu,Zn superoksid dismutazu (SOD1, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, SAD)
- mišje monoklonalno antitelo na glijalni kiseli fibrilarni protein za obeležavanje astrocita (eng. Glial fibrillary acidic protein – GFAP, 1:200, EMD Millipore, SAD)
- kozje poliklonalno antitelo na jonizovani adaptorski molekul 1 koji vezuje kalcijum za obeležavanje mikroglije (eng. Ionized calcium binding adaptor molecule 1 - Iba1, 1:250, Abcam, SAD)
- mišje monoklonalno antitelo na jedarni antigen neurona za obeležavanje neurona (eng. Neuronal nuclear antigen – NeuN, 1:100, EMD Millipore, SAD)

Preseci su inkubirani u rastvoru primarnih antitela preko noći na +4 °C u vlažnoj atmosferi kako bi se sprečilo isparavanje rastvora i sušenje preseka. Sledećeg dana je rađeno ispiranje preseka 3 puta po 10 minuta u 0,01 M PBS kako bi se uklonila primarna antitela koja se nisu vezala, a potom su preseci inkubirani u rastvoru 0,01 M PBS koji je sadržao odgovarajuća fluorescentno obeležena sekundarna antitela 2,5 h na sobnoj temperaturi u vlažnoj atmosferi i mraku kako bi se spečilo izbeljivanje fluorescentnih markera.

Korišćena su sledeća sekundarna antitela:

- magareće antitelo na proteine zeca, Alexa Fluor 555 (1:200; Invitrogen, SAD)
- magareće antitelo na proteine miša, Alexa Fluor 488 (1:200; Invitrogen, SAD)
- magareće antitelo na proteine koze, Alexa Fluor 488 (1:200; Invitrogen, SAD)

Preseci su potom isprani 5 puta po 5 minuta u 0,01 M PBS kako bi se uklonila sekundarna antitela koja se nisu vezala, i inkubirani 10 minuta u rastvoru 4,6 –diamidin-2-fenilindola (DAPI, 1:4000, Molecular Probes, SAD) u PBS zarad fluorescentnog obeležavanja jedarnog materijala. Preseci su ponovo ispirani 5 puta po 5 minuta u 0,01 M PBS, ostavljeni 10 minuta da se osuše, i nakon toga je na njih nanošen medijum za fiksiranje pokrovnog stakla (Mowiol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) i stavljeno pokrovno staklo. Za negativnu kontrolu bojenja primarna antitela su izostavljena. U svakoj seriji imunohistohemijskog bojenja korišćeni su preseci iz svih eksperimentalnih grupa.

Konfokalna mikroskopija

Snimci fluorescentno obeleženih preseka su napravljeni pomoću konfokalnog laserskog skenirajućeg mikroskopa LSM 710 (Carl Zeiss GmbH, Nemačka) uz upotrebu objektiva Plan-Neofluar 20/0,5 i Plan-Neofluar 40/1,3 Oil DIC. Za eksitaciju fluorescentnih boja korišćene su ekscitacione linije 488 nm argonskog lasera i 543 nm helijum-neonskog lasera. Emisiona svetlost je razdvajana u različite kanale upotrebom NFT 545 dihroičnog ogledala koje reflektuje svetlost talasne dužine manje od 545 nm u jednu detekcionu jedinicu, a u drugu propušta svetlost većih talasnih dužina. Potpuno razdvajanje emisione svetlosti zelenog dela spektra je postignuto uskopojasnim filterom

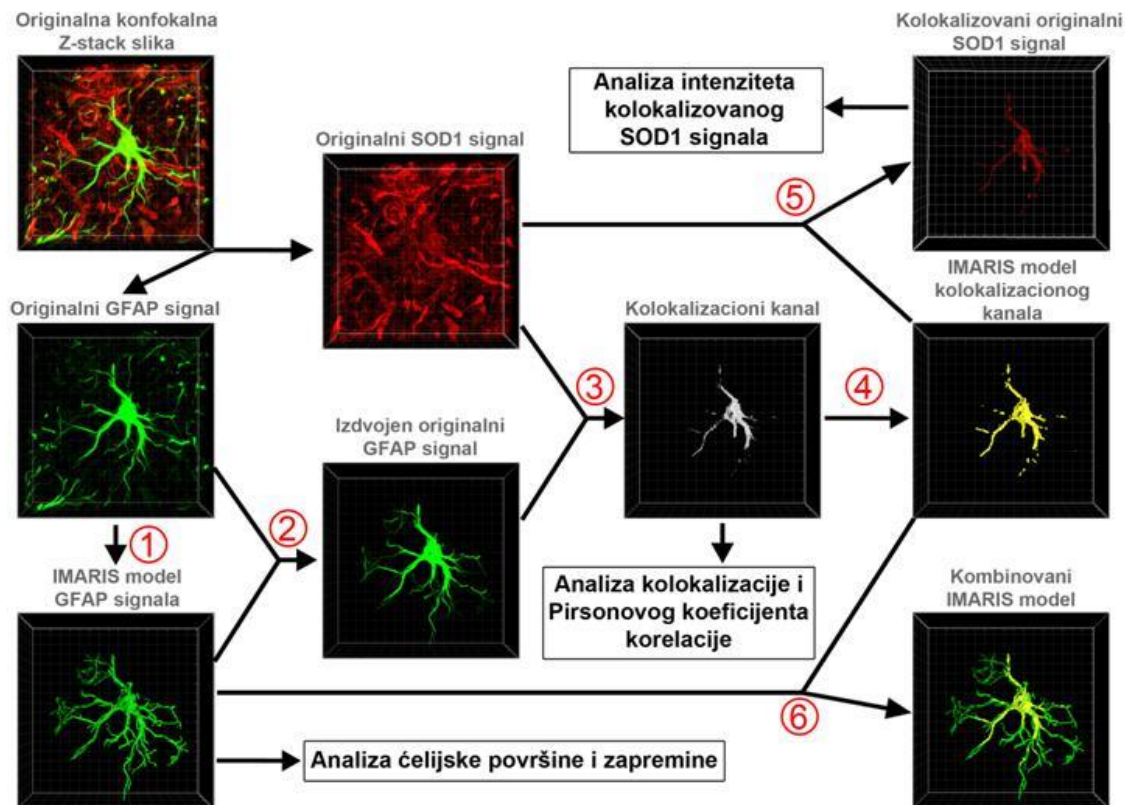
BP 505-530, a crvenog dela spektra širokopropusnim filterom LP 585. Za dobijanje 3D snimaka korišćena je opcija „Z-stack” uz korišćenje Nikvistovog kriterijuma za određivanje optimalne rezolucije po Z osi. Z-stack snimci približne ukupne debljine 15 μm su pravljani u koracima od po 0.48 μm , sa rezolucijom u X-Y ravni od 512×512 piksela. Podešavanja koja utiču na intenzitet signala kao što su intenzitet lasera, debljina optičkog preseka, brzina skeniranja i osetljivost detektora su održavana konstantnim tokom snimanja.

Analiza konfokalnih snimaka

Konfokalni snimci su analizirani u Zeiss LSM710 ZEN softverskom paketu. Kako bi se ispitalo prisustvo proliferacije glijalnih ćelija, i kako bi se procenila količina i ispitala distribucija SOD1 proteina u moždanom tkivu eksperimentalnih životinja urađena je analiza procenta GFAP ili Iba1 pozitivnih piksela, odnosno srednja vrednost intenziteta signala SOD1 pozitivnih piksela na konfokalnim slikama koje su snimljene pomoću objektiva Plan-Neofluar 20/0,5. Pozadinski signal je uklonjen sa svake slike na osnovu srednje vrednosti intenziteta piksela u nebojenim delovima slike. Na ovaj način je analizirano 4 do 5 snimaka iz svake životinje, što je ukupno iznosilo 16 do 20 snimaka po grupi.

3D snimci pojedinačnih astrocita ili mikroglijalnih ćelija napravljeni snimanjem preseka dvostruko obeleženih na GFAP ili Iba1 markere i SOD1 protein su analizirani u IMARIS softverskom paketu verzija 7.4.2 (Bittplane AG, Ciri, Švajcarska) po prethodno opisanom protokolu (Wagner et al., 2013). Prvo su na osnovu intenziteta piksela GFAP ili Iba1 signala u originalnim Z-stack konfokalnim snimcima napravljeni 3D površinski modeli pojedinačnih astrocita ili mikroglijalnih ćelija u modulu za rekonstrukciju površine IMARIS programa (Slika 8, 1). S obzirom na to da su konfokalni snimci pored signala koji potiče od ćelije od interesa sadržali i signal koji potiče od delova okolnih ćelija, urađeno je preklapanje 3D površinskog IMARIS modela i originalnog GFAP ili Iba1 Z-stack konfokalnog snimka kako bi se izdvojio samo signal koji potiče od ćelije od interesa (Slika 8, 2). Potom je urađena analiza kolokalizacije signala koji potiču od ćelije od interesa i originalnog SOD1 signala u kolokalizacionom

modulu IMARIS programa (Slika 8, 3). Pre analize kolokalizacije za automatsko uklanjanje nespecifičnog pozadinskog signala je upotrebljen Costes algoritam (Costes et al., 2004) koji je integrisan u IMARIS program.



Slika 8. Šematski prikaz toka analize 3D konfokalnih snimaka pomoću IMARIS programa.

Kao rezultat analize kolokalizacije signala dobijen je kolokolizacion kanal koji se sastoji samo iz piksela koji su sadržali i SOD1 i GFAP odnosno Iba1 signal (kolikalizovani pikseli), i u modulu za rekonstrukciju površine IMARIS programa je napravljen 3D model kolokolizacionog kanala (Slika 8, 4). Preklapanjem modela kolokolizacionog kanala i originalnog SOD1 signala izdvojeni su pikseli originalnog kolokolizovanog SOD1 signala (Slika 8, 5). Na kraju, 3D modeli pojedinačnih astrocita ili mikroglijalnih ćelija su preklapani sa 3D modelima kolokolizacionih kanala dobijeni analizom odgovarajućih ćelija kako bi se dobio kombinovani IMARIS model ispitivane ćelije (Slika 8, 6). Ukupna površina i zapremina 3D modela pojedinačnih astrocita i mikroglijalnih ćelija su praćene kako bi se ispitala morfologija ćelija, dok su procenat GFAP ili Iba1 pozitivnih piksela koji kolokolizuju sa SOD1 pozitivnih pikselima, Pirsonov koeficijent korelacije (jačina korelacija dva signala) između GFAP ili Iba1 i

SOD1 signala, kao i prosečan intenzitet piksela kolokalizovanog SOD1 signala analizirani kako bi se ispitala unutarćelijska distribucija i količina SOD1 u ovim glijalnim ćelijama. Na ovaj način je analizirano 9 do 10 snimaka oba tipa glijalnih ćelija iz svake životinje, što je ukupno iznosilo 36 do 40 snimaka po grupi za svaki tip glijalnih ćelija.

Određivanje čistoće primarne kulture astrocita i ekspresije SOD1 proteina u astrocitima in vitro primenom imunocitohemijske metode

Da bi se odredio udeo astrocita u kulturi ćelija izolovanih iz korteksa NTg i ALS pacova na gore opisan način, kao i da bi se ispitala ekspresija SOD1 proteina u astrocitima iz ove dve grupe životinja, astrociti su zasejavani na mikroskopska stakla prečnika 25 mm prethodno prevučena poli L–lizinom u gustini od 10^4 ćelija/cm² površine. Nakon dostizanja 70% konfluentnosti ćelija na staklima pristupalo se imunocitohemijskom bojenju. Ćelije su prvo ispirane u PBS kako bi se uklonili tragovi medijuma za gajenje, a potom fiksirane 20 minuta u 4% rastvoru PFA. Posle novog ispiranja ćelija u PBS tri puta po 5 minuta, rađena je permeabilizacija ćelija i blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela u rastvoru PBS koji je sadržao 5% magareći serum, 1% BSA i 0,05% Triton X-100. Potom je rađena inkubacija ćelija u rastvoru PBS koji je sadržao kombinaciju odgovarajućih primarnih antitela, 1% magareći serum i 0,02% Triton X-100.

Korišćena su sledeća primarna antitela:

- mišje monoklonalno antitelo na glijalni kiseli fibrilarni protein za obeležavanje astrocita (eng. Glial fibrillary acidic protein – GFAP, 1:200, EMD Millipore, SAD)
- kozje poliklonalno antitelo na jonizovani adaptorski molekul 1 koji vezuje kalcijum za obeležavanje mikroglije (eng. Ionized calcium binding adaptor molecule 1 - Iba1, 1:250, Abcam, SAD)
- zečje poliklonalno antitelo na Cu,Zn superoksid dismutazu (SOD1, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, SAD)

Ćelije su inkubirane u rastvoru primarnih antitela preko noći na +4°C. Sledećeg dana je rađeno ispiranje ćelija 3 puta po 10 min u 0,01 M PBS kako bi se uklonila primarna antitela koja se nisu vezala, a potom su ćelije inkubirane u rastvoru PBS koji je sadržao odgovarajuća fluorescentno obeležena sekundarna antitela 2,5 h na sobnoj temperaturi u mraku kako bi se spečilo izbeljivanje fluorescentnih markera.

Korišćena su sledeća sekundarna antitela:

- magareće antitelo na proteine miša, Alexa Fluor 488 (1:200; Invitrogen, SAD)
- magareće antitelo na proteine miša, Alexa Fluor 555 (1:200; Invitrogen, SAD)
- magareće antitelo na proteine koze, Alexa Fluor 488 (1:200; Invitrogen, SAD)
- magareće antitelo na proteine zeca, Alexa Fluor 555 (1:200; Invitrogen, SAD)

Ćelije su potom ispirane 5 puta po 5 min u PBS kako bi se uklonila sekundarna antitela koja se nisu vezala, i inkubirane 10 min u rastvoru 4,6 –diamidin-2-fenilindola (DAPI, 1:4000, Molecular Probes, SAD) u PBS u cilju fluorescentnog obeležavanja jedarnog materijala. Nakon još 5 ispiranja po 5 min u PBS, mikroskopski preparati sa obojenim ćeljama su postavljeni na standardna mikroskopska stakla preko kapljice medijuma za fiksiranje (Mowiol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka). U svakoj seriji imunocitohemijskog bojenja korišćene su ćelije iz obe eksperimentalne grupe. Obojene ćelije su čuvane na +4°C do snimanja na konfokalnom laserskom skenirajućem mikroskopu.

Snimci imunocitohemijski obojenih ćelija su napravljeni pomoću konfokalnog laserskog skenirajućeg mikroskopa LSM 510 (Carl Zeiss GmbH, Nemačka) uz upotrebu objektiva Plan-Neofluar 20/0,5. Za eksitaciju fluorescentnih boja korišćene su ekscitacione linije 488 nm argonskog lasera i 543 nm helijum-neonskog lasera. Emisiona svetlost je razdvajana u različite kanale upotrebom NFT 545 dihroičnog ogledala koje reflektuje svetlost talasne dužine manje od 545 nm u jednu detekcionu jedinicu, a u drugu propušta svetlost većih talasnih dužina. Potpuno razdvajanje emisije svetlosti zelenog dela spektra je postignuto uskopojasnim filterom BP 505-530, a crvenog dela spektra širokopropusnim filterom LP 585. Signal DAPI boje je

sniman propuštanjem svetlosti živine lampe kroz ekscitacioni filter za ovu boju. Slike dobijene sa istog vidnog polja su potom preklapane.

Ispitivanje proizvodnje superoksidnog radikala astrocita u kulturi pomoću MitoSox Red indikatora

Da bi se ispitala proizvodnja superoksidnog radikala u kulturi astrocita izolovanih iz NTg i ALS životinja korišćen je fluorescentni indikator MitoSox Red (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD) koji reaguje specifično sa superoksidnim radikalom, ali ne i sa ostalim reaktivnim kiseoničnim i azotnim vrstama. Ovaj indikator lako ulazi u žive ćelije gde se specifično akumulira u mitohondrijama. Nakon oksidacije pod uticajem superoksidnog radikala indikator emituje fluorescentnu svetlost u crvenom delu spektra, pa je zbog toga pogodan za snimanje pomoću fluorescentne mikroskopije. Maksimum absorpcije indikatora je na 510 nm, a emisije na 580 nm. Za ove eksperimente astroцити su zasejevani na mikroskopska stakla prečnika 25 mm u gustini od 10^4 ćelija/cm² površine. Zasejane ćelije su održavane u DMEM+ medijumu do dostizanja 70% konfluentnosti. Ђelije su potom isprane 3 puta sa vanćelijskim rastvorom (ECS) koji se sastojao iz 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES i 10 mM glukoze rastvorene u ddH₂O, a zatim inkubirane u 5 μM rastvoru MitoSox indikatora u ECS 10 minuta na 37°C u inkubatoru. Nakon dodatna 3 ispiranja u ECS radi otklanjanja viška boje koje nije ušla u ćelije, stakla sa astroцитима su prebacivana u mikroskopsku komoricu za snimanje napunjenu sa 1 ml ECS.

Snimanje je rađeno na konfokalnom laserskom skenirajućem mikroskopu LSM 510 (Carl Zeiss GmbH, Nemačka) uz upotrebu objektiva Achroplan 40x/0,8 W. Za ekscitaciju fluorescentnog indikatora korišćena je ekscitaciona linija 488 nm argonskog lasera. Emisiona svetlost je razdvajana u različite kanale upotrebom NFT 545 dihroičnog ogledala koje je u detekcionu kanal propuštalo samo svetlost talasne dužine veće od 545 nm, i dodatno filtrirana širokopropusnim filterom LP 560. Rađena je vremenska serija snimanja obeleženih astrocita u kojoj je snimanje fluorescence MitoSox indikatora vršeno na svakih 60s. Prva četiri minuta snimanja su služila za

uspostavljanje bazne linije, odnosno određivanja osnovne stope proizvodnje superoksidnog radikala u ispitivanim ćelijama. Posle četiri minuta, povećana proizvodnja superoksidnog radikala je izazivana dodavanjem rastvora vodonik-peroksida u ECS, tako da njegova finalna koncentracija u komorici za snimanje bude 250 odnosno 500 μM . Nakon dodavanja vodonik-peroksida snimanje je vršeno narednih 36 minuta. Dobijene vremenske serije merenja su analizirane u pratećem Carl Zeiss programu verzija 3.2 SP2. Za svaku vremensku tačku izračunata je srednja vrednost intenziteta MitoSox signala po celom kadru nakon uklanjanja pozadinskog signala na osnovu srednje vrednosti intenziteta piksela u neobojenim delovima slike. Dobijene srednje vrednosti intenziteta su potom normalizovane u odnosu na srednju vrednost intenziteta bazne linije na osnovu jednačine $(F-F_0)/F_0$ gde je F srednja vrednost intenziteta signala u određenoj vremenskoj tački, a F_0 srednja vrednost intenziteta bazne linije. Na ovaj način su rezultati predstavljeni kao promena količine superoksidnog radikala nakon stimulacije vodonik-peroksidom u odnosu na njegovu osnovnu količinu u ispitivanim ćelijama.

Ispitivanje unutarćelijske strukture astrocita u kulturi pomoću mikroskopije Rentgenskim zračenjem niskih energija

Da bi se ispitala unutarćelijska struktura astrocita u kulturi izolovanih iz NTg i ALS životinja, astrociti su zasejavani na zlatne mikroskopske mrežice prekrivene perforiranim ugljenikovom folijom debljine 10 nm (Au-G200F1, Quantifoil, Jena, Nemačka) u gustini od 10^4 ćelija/ cm^2 površine. Posle 2 dana gajenja u DMEM+ medijumu, mrežice sa astrocitima su ispirane u PBS i podvrgnute vitrifikaciji, tj. trenutnom zamrzavanju u tečnom etanu koji je ohlađen tečnim azotom (Salditt and Ducic, 2014) korišćenjem Leica EM GP Automatic Plunge Freezer uređaja (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka). Kako bi se proverila očuvanost ćelija uzorci su pregledani pomoću svetlosnog mikroskopa Zeiss Axio Scope (Zeiss, Jena, Nemačka) opremljenog sa LINKAM CMS196 komoricom (Linkam Scientific, Waterfield, Engleska) za snimanje uzoraka na temperaturi tečnog azota. Zamrznuti uzorci su potom ubačeni u nosače sa tečnim azotom i čuvani u tim uslovima do trenutka snimanja. Mikroskopija pomoću rentgenskog zračenja energije 520 eV je urađena pomoću “full-

filed” transmisionog mikroskopa sa rentgenskim zračenjem na Mistral linijskom snopu ALBA sinhrotrona (ALBA synchrotron light source, Cerdanyolla del Valles, Španija). Snimci dimenzija 10 x 10 μm različitih regiona citoplazme astrocita su snimljeni uz rotaciju uzorka od + 70° do – 70°, sa uglom pomeraja od 1° između snimaka i vremenom snimanja od 1s po snimku. Obrada napravljenih snimaka je rađena u IMOD programu verzija 4.9 (University of Colorado, Boulder, SAD).

Rentgenska fluorescentna mikroskopija (eng. X-ray fluorescence imaging – XRF)

Priprema tkiva

Po 3 NTg i ALS životinje su anestetizirane intraperitonealnom injekcijom mešavine ketamina (0,1 ml / 100 g t.m.) i ksilazina (0,06 ml / 100 g t.m.). Svaka životinja je žrtvovana dekapitacijom, i glava je odmah stavljena na zaleđenu ploču kako bi se sprečilo propadanje tkiva. Moždano tkivo je brzo izolovano, zavijeno u parafilm i zamrznuto na -80 °C do dalje upotrebe. Mozak je zatim isečen na koronalne preseke debljine 20 μm upotrebom kriostata (CM1850, Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka) na temperaturi od -25°C, i preseki su nanešeni na siliko-nitridne membrane dimenzija 7.5 x 7.5 x 0.2 mm (Silson Ltd., Northampton, Velika Britanije). Preseci na membranama su potom osušeni u liofilizatoru na slabom vakuumu i inicijalno na temperaturi tečnog azota (-196 °C), a potom čuvani na sobnoj temperaturi iznad silika gela koji služi za apsorpciju vlage.

Pravljenje XRF snimaka

Pre XRF preseki su analizirani na običnom svetlosnom mikroskopu kako bi se proverila očuvanost tkiva i odredili regioni tkiva koji odgovaraju regionima ispitivanim pomoću imunohistohemije. XRF je urađen na microXAS (X05LA) linijskom snopu Švajcarskog izvora svetlosti (eng. Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut, Villigen, Švajcarska), na energiji ekscitacije od 9.8 keV. Preseci su snimani u X-Y ravni sa mikro-fokusiranim Rentgenskim zracima dimenzija 2 × 2 μm . Snimanjem su napravljene XRF mape koje prikazuju koncentraciju elemenata (P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe,

Ni, Cu i Zn) u tkivu veličine 200×200 μm, sa korakom snimanja od 2 μm i vremenom zadržavanja po pikselu od 200 ms. Na ovaj način je napravljeno 2 do 3 XRF mape za svaki element u oba analizirana regiona mozga (facijalno jedro moždanog stabla i dentatni girus hipokampusa) iz svake životinje, što je ukupno iznosilo 6 do 9 snimaka po regionu mozga po grupi za svaki element.

Analiza XRF mapa

Rekonstrukcija i analiza XRF mapa je urađena u Matlab softverskom paketu verzija 7.12 (MathWorks, Natick, SAD). Za svaki analizirani uzorak izračunata je srednja vrednost intenziteta piksela sa XRF mape za svaki element. Zatim je izračunat prosek srednjih vrednosti intenziteta piksela za sve mape određenog elementa iz istog regiona mozga NTg životinja. Na kraju, srednja vrednost intenziteta piksela za svaku mapu je normalizovan u odnosu na prosek srednjih vrednosti intenziteta piksela NTg životinja za odgovarajući element i region mozga kako bi rezultati predstavili kao promena u količini elemenata u odnosu na prosečnu količinu elementa u NTg uzorcima. Normalizovane srednje vrednosti intenziteta piksela su korišćene za statističku analizu.

Biohemijско ispitivanje parametara oksidativnog stresa

Priprema homogenata tkiva

Po 6 NTg, preALS i ALS životinja je žrtvovano dekapitacijom i glave su odmah ubačene u posudu sa tečnim azotom u cilju trenutnog zamrzavanja tkiva. Glave su potom izvađene iz tečnog azota i stavljene na zaleđenu ploču na kojoj je urađena izolacija kompletnog tkiva moždanog stabla i oba hipokampusa iz mozga svake životinje. Izolovana tkiva su potom homogenizovana u ledenom rastvoru koji je sadržao 0,25 M saharozu, 0,1 mM EDTA i 50 mM K-Na fosfatni pufer, pH 7.2. Homogenati su centrifugirani dva puta po 15 minuta na 1850 x g na 4°C. Dobijeni supernatant je pokupljen, sonifikovan 3 puta po 30 sekundi i potom zamrznut i čuvan na -70°C do dalje upotrebe.

Određivanje koncentracije nitrita

Koncentracija nitrita, stabilnog finalnog proizvoda oksidacije azotnim oksidom (NO), je određivana metodom po Griess-u (Navarro-Gonzalvez et al., 1998) i korišćena kao indirektni indikator proizvodnje NO u tkivu. Ukratko, koncentracija nitrita je određivanja mešanjem 50 μ l uzorka sa 50 μ l Griess-ovog reagensa koji se sastojao iz 1,5% sulfanilamida u 1 M HCl i 0,15% N-(1-naftil) etilen-diamin-dihidrohlorida u destilovanoj vodi. Absorbanca dobijene smeše na 540 nm je određivanja nakon 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, i koncentracija nitrita u uzorku je izračunata na osnovu standardne krive napravljene na osnovu merenja absorbance smeše Griess-ovog reagensa i različitih koncentracija natrijum nitrita (Sigma Aldrich GmbH, Nemačka).

Određivanje proizvodnje superoksidnog radikala

Proizvodnja superoksidnog anjon radikala ($O_2^{\bullet-}$) je određena metodom koja se zasniva na razgradnji nitro plavo tetrazolijuma (NBT) u monoformazan usled reakcije sa $O_2^{\bullet-}$ u baznom reakcionom medijumu zasićenom azotom (Auclair i Voisin, 1985). Reakcija je započinjana dodavanjem 0,05 ml uzorka u 1 ml reakcione smeše koja se sastojala iz 0,1 M NBT u 50 mM natrijum fosfatnom puferu pH 8,6, sa 0,1 mM EDTA i 0,1 mg/ml želatina. Promena absorbance usled razgradnje NBT je spektrofotometrijski praćena 5 minuta na 550 nm.

Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze 1 i 2

Aktivnosti obe izoforme antioksidativnog enzima superoksid dismutaze, SOD1 (Cu,Zn SOD – citoplazmatska izoforma) i SOD2 (Mn SOD – mitohondrijalna izoforma) u izolatima tkiva su određivane adrenalinskom metodom (Sun i Zigman, 1978). Ukupna SOD aktivnost je merena na osnovu inhibicije spontane auto-oksidacije epinefrina koja je spektrofotometrijski praćena na 480 nm. Enzimska aktivnost SOD u uzorku je praćena u 50 mM natrijum karbonatnom puferu pH 10.2, koji je sadržao 0,1 mM EDTA, nakon dodavanja 10 mM epinefrina. Enzimska aktivnost je izražavana u jedinicama

(količina uzorka koja izaziva smanjenje spontane auto-oksidacije epinefrina za 50%) po mg proteina. Aktivnost SOD2 u uzorcima je određivana na isti način, ali nakon dodavanja 0,1 mM KCN u reakcionu smešu kako bi se inhibirala aktivnost SOD1. Aktivnost SOD1 je potom određivana oduzimanjem aktivnosti SOD2 od ukupne SOD aktivnosti.

Određivanje indeksa lipidne peroksidacije

Malondialdehid (MDA) je proizvod reakcije polinezasićenih masnih kiselina sa tiobarbituratnom kiselinom, i njegova koncentracija se uzima kao indeks lipidne peroksidacije (ILP). ILP je meren spektrofotometrijski kao količina reaktivnih vrsta tiobarbituratne kiseline. Količina formiranih reaktivnih vrsta tiobarbituratne kiseline je određivanja merenjem absorbance na 533 nm nakon tretiranja uzoraka sa 1 ml hladnog reagensa tiobarbituratne kiseline koji se sastojao iz 15% trihlorsirćetne kiseline, 0,1 M HCl i 0,75% tiobarbituratne kiseline, i zagrevanja na 95°C u prisustvu 50 µM desferoksamina kako bi se sprečila lipidna peroksidacija katalizovana gvožđem prisutnim u uzorku (Rehncrona et al., 1980).

Svi eksperimenti su urađeni u triplikatu, i svaki mereni parametar je normalizovan u odnosu na ukupnu količinu proteina u odgovarajućem uzorku, koja je određena metodom po Loriju (Lowry et al., 1951) na osnovu standardne krive napravljene korišćenjem rastvora sa različitim koncentracijama albumina iz telećeg seruma (Sigma Aldrich GmbH, Nemačka).

Elektronska paramagnetna rezonancija

Elektronska paramagnetna rezonancija (EPR) je spektroskopska tehnika kojom se detektuje proces rezonantne apsorpcije mikrotalasnog zračenja u homogenom magnetnom polju u paramagnetskim sistemima koji poseduju najmanje jedan nesparni elektron, kao što su slobodno radikalske vrste (SRV). Međutim, u *in vivo* sistemima SRV su najčešće izrazito kratkoživeće da bi mogle da se detektuju direktno pomoću EPR spektroskopije. Umesto toga, redoks status odnosno bioreduktivni kapacitet *in vivo*

sistema može da se istraži korišćenjem aminoksil radikala, odnosno nitroksida. Nitroksidi su stabilni dugo živeći slobodni radikali, koji nakon ubacivanja u živi organizam mogu da reaguju sa unutarćelijskim bioreduktantima, kao što su mitohondrijalni enzimi ili citosolni askorbat, ili sa endogenim SRV što rezultuje u njihovoj redukciji u hidroksilamine koji se ne mogu detektovati EPR spektroskopijom. Stoga, praćenje stope redukcije nitroksida u živim organizmima pomoću EPR spektroskopije može da se primeni kao metoda za neinvazivnu procenu redoks statusa i prisustvo oksidativnog stresa (Valgimigli et al., 2001; Elas et al., 2012). Za *in vitro* i *ex vivo* eksperimente na uzorcima male količine i niske koncentracije se uobičajeno koristi EPR spektroskopija u „X” oblasti (X-band), koja podrazumeva korišćenje mikrotalasa čija frekvencija spada u opseg od 9 - 10 GHz, čime se postiže neophodna osetljivost detekcije. Međutim, prilikom *in vivo* EPR spektroskopije na velikim biološkim uzorcima, kao što su miš ili pacov, dolazi do nespecifične (nerezonantne) apsorpcije mikrotalasnne energije usled prisustva velike količine vode u uzorku što smanjuje dubinu prodiranja mikrotalasa u uzorak. Problem dubine prodiranja mikotalasa u ovakve uzorke se može rešiti smanjenjem frekvencije mikrotalasa, i iz tog razloga se za *in vivo* eksperimente koristi EPR spektroskopije u „L” oblasti (L-band), koja podrazumeva korišćenje mikrotalasa čija frekvencija spada u opseg od 1 - 2 GHz.

U EPR eksperimentima su korišćeni sledeći aminoksil radikali (nitroksidi):

- Tempol (4-Hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin 1-oksil),
- 3-karbamoil proksil – 3CP (3-Karbamoil-2,2,5,5-tetrametil-1-pirolidinoksi), i
- 3-karboksi proksil – 3CxP (3-Karboksi-2,2,5,5-tetrametil-1- pirolidinoksi),

(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka). Hemijske strukture nitroksida su prikazane na slici 9.



Slika 9. Hemijske strukture nitroksida korišćenih u eksperimentima.

In vitro i ex vivo EPR spektroskopija

Za eksperimente redukcije nitroksida *in vitro* 30 μ l rastvora nitroksida i askorbinske kiseline u PBS-u, u različitim odnosima koncentracija, su uvučene u teflonska creva (Zeus Industries, SAD) propustljiva za gasove, koja su onda postavljena u kvarcnu kivetu i potom u ER 4123SHQE X-band rezonator EPR spektrometra (Bruker Biospin Elexsys II E540 EPR spektrometar, Billerica, Masačusets, SAD). EPR spektri su snimani 30 minuta na sobnoj temperaturi u intervalima od po 1 minut. Za *ex vivo* eksperimente 1 ml sveže krvi je dreniran iz srca pacova i stavljen u epruvetu obloženu antikoagulantom K₂EDTA (Becton Dickinson and Company, USA). U krv je potom dodavano po 5 μ l rastvora određenog nitroksida tako da finalne koncentracije nitroksida u krvi budu 0,05 mM za Tempol i 3CP, odnosno 0,025 mM za CxP, što je približno odgovaralo koncentraciji nitroksida u krvotoku životinja nakon njihovog ubrizgavanja u *in vivo* eksperimentima. Tako dobijene mešavine sveže krvi i nitroksida su uvučena u teflonska creva koja su onda postavljena u kivetu i potom u ER 4123SHQE X-band rezonator EPR spektrometra. EPR spektri su potom snimani 30 minuta na sobnoj temperaturi u intervalima od po 1 minut. Podešavanja EPR uređaja za *in vitro* i *ex vivo* eksperimente su bila: frekvencija mikrotalasa 9,5 GHz, snaga mikrotalasa 10 mW, modulaciona amplituda 2 G, modulaciona frekvencija 100 kHz, vreme snimanja 60s.

In vivo EPR spektroskopija

Za merenja *in vivo* EPR spektroskopijom korišćeno je 6 presimptomatskih ALS pacova za praćenje kinetike redukcije spinske probe 3CP, odnosno 3 presimptomatska ALS pacova za praćenje kinetike redukcije spinske probe 3CxP. Nakon razvoje simptoma iste životinje su ponovo iskorišćene kao simptomatske ALS životinje za praćenje kinetike redukcije ove dve spinske probe. Odgovarajući broj netransgenih Sprague-Dawley pacova, koji su po starosti odgovarali simptomatskim ALS životinjama, su korišćeni kao kontrole. Za praćenje kinetike redukcije spinske probe Tempol korišćene su 3 netransgene životinje koje su po starosti odgovarale simptomatskim ALS životinjama. Za praćenje kinetike redukcije spinskih proba 3CP i 3CxP u životinjama kojima je izazvano zaustavljanje srčanog rada injekcijom rastvora

kalijum hlorida, korišćene su 4 netransgene životinje (po 2 za svaku spinsku probu) koje su po starosti odgovarale simptomatskim ALS životinjama.

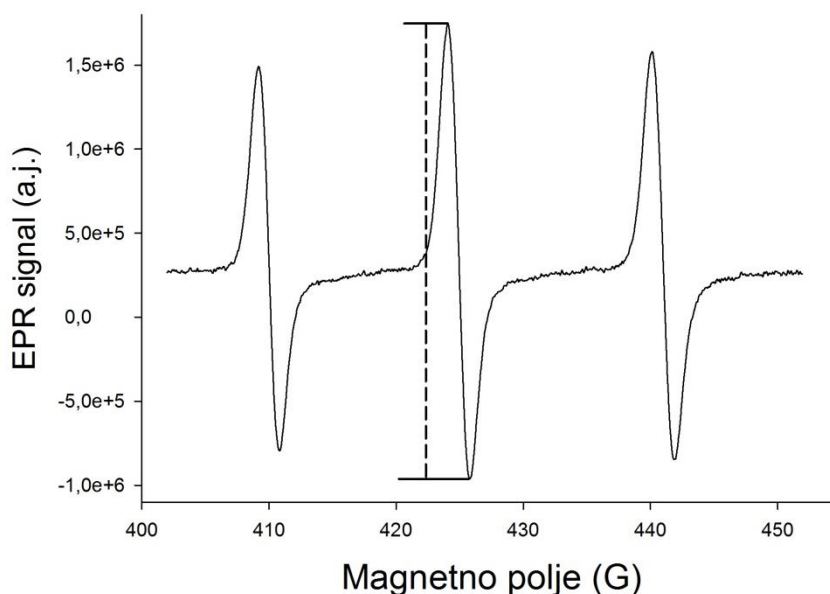
Životinje su anestetizirane intraperitonealnom injekcijom mešavine ketamina (0,1 ml / 100 g t.m.) i ksilazina (0,06 ml / 100 g t.m.), i u repnu venu životinji je uvedena braunila preko koje je injektovan rastvor spinske probe. Životinje su potom stavljane u nosač za snimanje koji poseduje sistem za termoregulaciju kojim se telesna temperatura životinja održavala na nivou od 35 ± 3 °C tokom snimanja i trajanja anestezije (mereno analnom termo-sondom). Životinje su postavljene tako da leže na ventralnoj strani i nosač sa životinjom je uveden u rezonantni prostor EPR spektrometara tako da glava životinje uđe u ER 540R36 L-band rezonator prečnika 36 mm (**Slika 10**). Rastvor nitroksida u fiziološkom rastvoru koncentracije 2 $\mu\text{mol/g}$ t.m. Tempol ili 3CP, odnosno 1 $\mu\text{mol/g}$ t.m. 3CxP, zapremine 1 ml je ubrizgan kroz braunilu, i potom su EPR spektri snimani 60 minuta u intervalima od po 1 minut. Da bi se dovelo do zaustavljanja srčanog rada i prestanka cirkulacije, 2 ml rastvora kalijum hlorida (200 mg/ml) je injektovano u repnu venu životinja 2 minuta nakon injekcije rastvora nitroksida što je odgovaralo trenutku maksimalne koncentracije nitroksida u glavi životinje. Podešavanja EPR uređaja za *in vivo* eksperimente su bila: frekvencija mikrotalasa 1,2 GHz, snaga mikrotalasa 11,38 mW, modulaciona amplituda 2 G, modulaciona frekvencija 30 kHz, vreme snimanja 8s, broj akumulacija 2.



Slika 10. Eksperimentalna postavka za EPR spektroskopiju *in vivo*. Slike predstavljaju prikaz EPR uređaja (levo) i položaj životinje u rezonatoru tokom snimanja (desno)

Kinetičko modelovanje redukcije spinskih proba

Normalizovana visina između gornjeg i donjeg maksimuma središnje linije tripleta EPR spektra nitroksida je definisana kao intenzitet signala koji je proporcionalan koncentraciji spinske probe (Slika 11). Kako bi se izračunalo vreme poluredukcije nitroksida *in vivo* (vreme koje je neophodno da intenzitet EPR signala nitroksida padne na 50% od njegove maksimalne vrednosti) početni nagib kinetika redukcije nitroksida je podešavan monoeksponencijalnom funkcijom pretpostavljajući proces pseudo-prvog reda.



Slika 11. Merenje intenziteta EPR signala. Prikaz tipičnog EPR spektra 3CP na kojem je isprekidanom linijom označena normalizovana visina između gornjeg i donjeg maksimuma središnje linije tripleta spektra koja predstavlja intenziteta signala nitroksida. a.j. – arbitrarne jedinice.

Pored toga, kako bi se preciznije razložili procesi koji utiču na redukciju *in vivo*, redukcione kinetike nitroksida su podešavane dvo-komornom matematičkom modelu sa 3 faktora koji doprinose promenama intenziteta EPR signala spinske probe: 1. uklanjanje krvotokom; 2. distribucija probe iz krvotoka u tkivo; 3. redukcija probe u tkivu. Na osnovu ovog modela analiza farmakokinetike je urađena pomoću jednačine:

$$y = \left(1 + \frac{k_{td}}{k_{tr} - k_{td} - k_{bc}} \right) e^{-(k_{bc} + k_{td})x} - \frac{k_{td}}{k_{tr} - k_{td} - k_{bc}} e^{(-k_{tr})x}$$

gde je x vremenska tačka detektovanja EPR signala, y intenzitet EPR signala spinske probe, k_{bc} konstanta brzine uklanjanja probe krvotokom, k_{td} konstanta brzine distribucije probe iz krvotoka u tkivo i k_{tr} konstanta brzine redukcije probe u tkivu. Kinetike redukcije spinskih proba dobijene u *in vitro* i *ex vivo* eksperimentima su podešene monoeksponencijalnom funkcijom pretpostavljajući proces pseudo-prvog reda.

Oslikavanje magnetnom rezonancijom

Za eksperimente oslikavanja magnetnom rezonancijom (MRI) iskorišćeno je 3 preALS i 3 ALS pacova, dok su kao kontrole upotrebljena 3 NTg pacova koji su po starosti odgovarali ALS životinjama. Životinje su anestetizirane intraperitonealnom injekcijom mešavine ketamina (0,1 ml / 100 g t.m.) i ksilazina (0,06 ml / 100 g t.m.), a u repnu venu životinja je uvođena braunila preko koje je kasnije injektovan rastvor kontrastnog agensa. Duboka anestezija je potvrđivana odsustvom kornealnog refleksa i refleksa povlačenja zadnjih ekstremiteta, nakon čega su životinje postavljane na nosač od stiropora tako da leže na stomaku, i stavljanje u MRI uređaj. Snimanje je radjeno na kliničkom 1,5 T Avanto MRI uređaju (Siemens, Minhen, Nemačka). T1-naglašeni snimci glave životinja su napravljeni pomoću površinske zavojnice prečnika 3 cm, sa vremenom ponavljanja od 400 ms, eho vremenom od 23 ms, debljinom preseka od 1,5 mm, i dimenzijama vokseli 1,5 x 0,2 x 0,3 mm. Nakon prve serije snimanja, životinjama je preko braunile ubrizgavan rastvor gadolinijumskog kontrastnog agensa Dotarema (Guerbetu, Vilpent, Francuska) u fiziološkom rastvoru koncentracije 0,02 mmol/kg t.m., i nakon 2 minuta su napravljeni post-kontrastni T1-naglašeni snimci glave životinja sa istim podešavanjima kao za prvu seriju snimanja. Po završetku snimanja životinje su zagrevane i posmatrane do buđenja i potpunog oporavka od anestezije. Obrada MRI snimaka je urađena u pratećem Syngo FastView programu (Siemens, Minhen, Nemačka). Oduzimanjem T1-naglašenih slika pre davanja kontrastnog agensa od post-kontrastnih slika dobijene su diferencijalne slike na kojima mesta hiperintenziteta MRI signala predstavljaju mesta ulaska kontrasta u tkivo mozga, što ukazuje na povećanu propustljivost ili oštećenje krvno-moždane barijere.

Statistička analiza

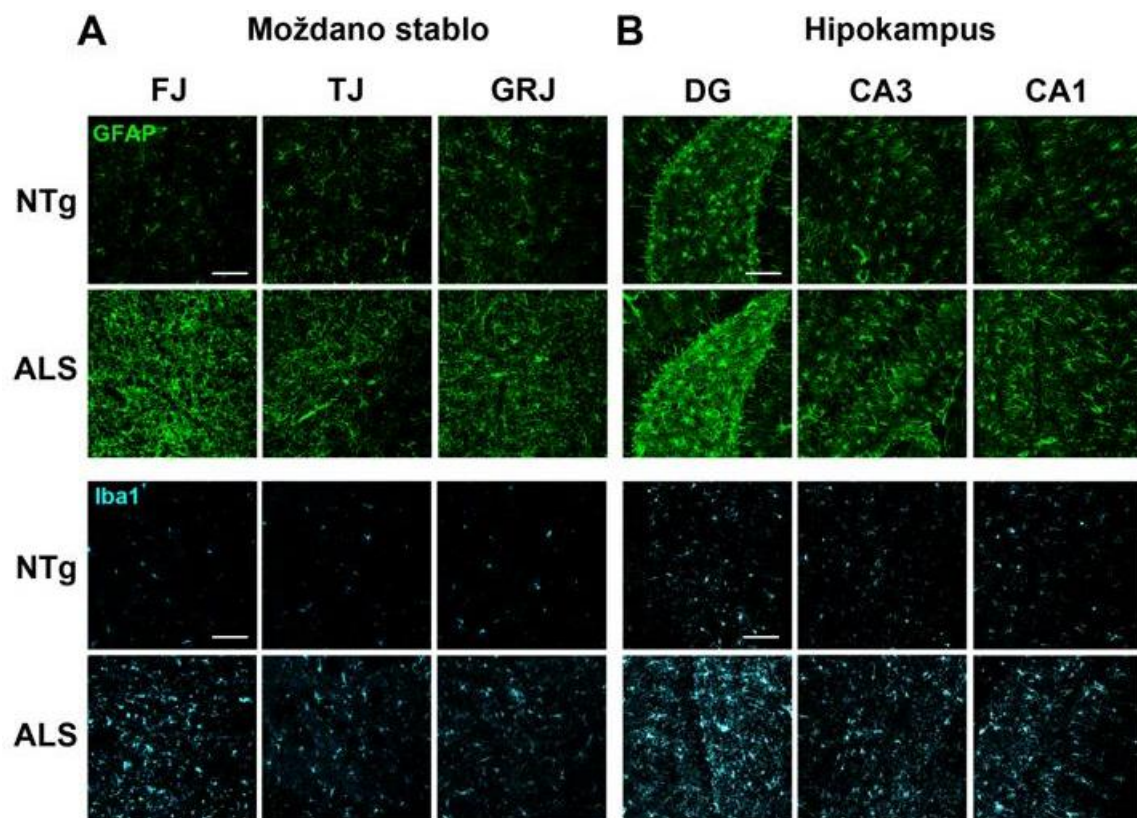
Statističke analize su rađene u programu IBM SPSS Statistics verzija 20 (IBM Analytics, NY, SAD). Statistička značajnost razlika između više grupa je proveravana jednofaktorskom analizom varijanse sa Bonferroni *post hoc* testom. U slučajevima kada podaci nisu prolazili normalnu raspodelu korišćen je neparametrijski Kruskal Wallis test analize varijanse sa Dunn-Bonfferoni *post-hoc* testom. Za proveravanje statističke značajnosti razlika između dve grupe korišćen je Studentov t test. Razlike sa vrednostima $\alpha = 0.05$ i $p < 0.05$ su smatrane kao statistički značajne. Grafički prikaz rezultata je urađen pomoću programa SigmaPlot verzija 11 (Systat Software, Bangalore, Indija).

Rezultati

Ispitivanje histoloških promena u moždanom tkivu presimptomatskih i simptomatskih hSOD1 G93A pacova

Imunohistohemijska analiza glijalnih markera u moždanom stablu i hipokampusu

Kako bi se ispitalo prisustvo aktivacije i proliferacije astrocita i mikroglialnih ćelija u različitim delovima moždanog stabla i hipokampusu, preseci moždanog tkiva NTg i ALS životinja su imunohistohemijski obeleženi na markere ovih ćelija, GFAP odnosno Iba1. Imunohistohemija je pokazala povećano bojenje na GFAP i Iba1 u facijalnom, trigeminalnom i gigantocelularnom retikularnom jedru moždanog stabla,

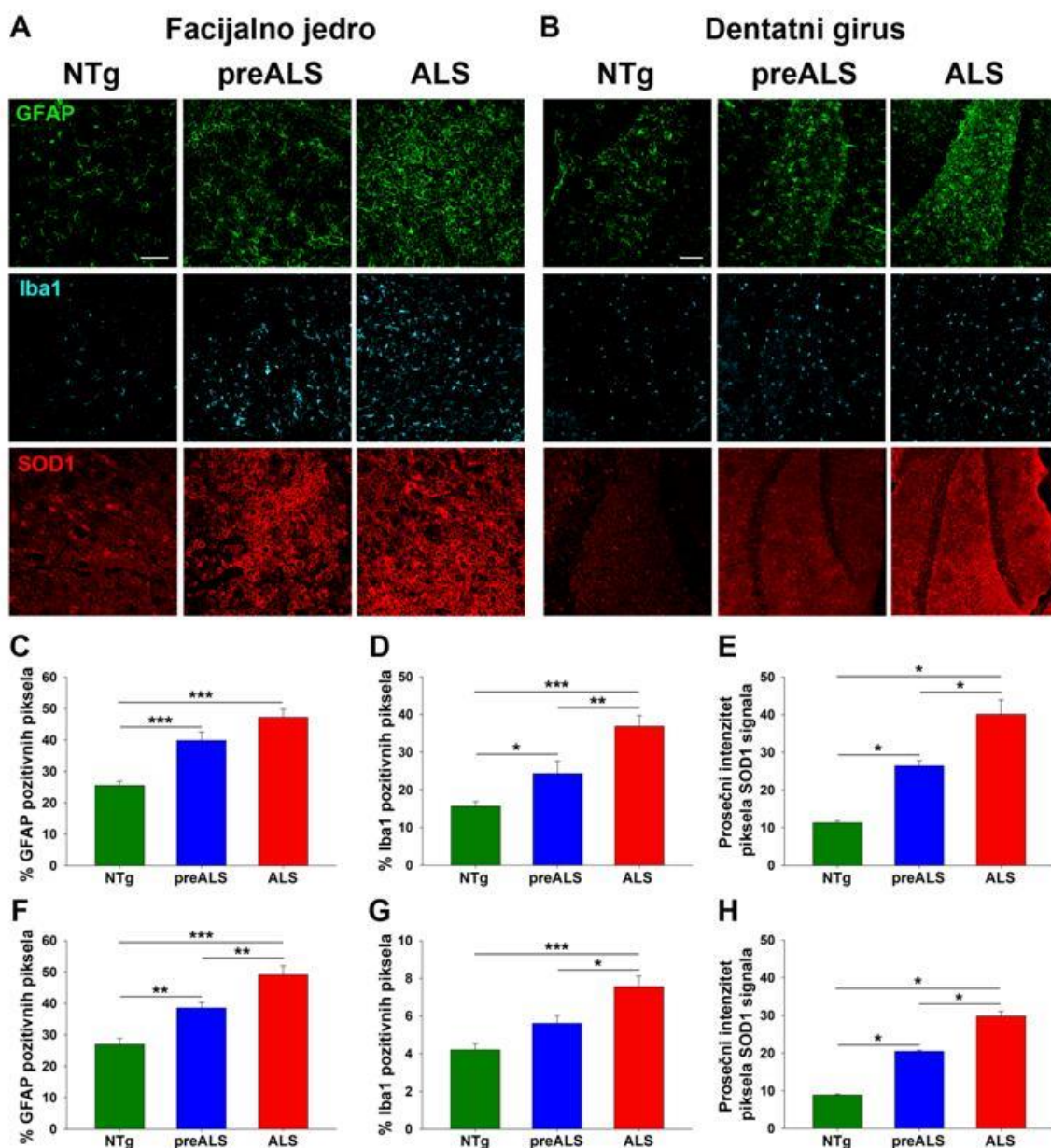


Slika 12. Proliferacija astrocita i mikroglije u različitim regionima moždanog stabla i hipokampusu u ALS životinjama. Konfikalne slike imunofluorescentnog bojenja na GFAP kao marker astrocita i Iba1 kao marker mikroglije u moždanom preseccima moždanog stabla (A) i hipokampusu (B) NTg i ALS životinja. Skala iznosi 100 μ m. FJ – facijalno jedro, TJ – trigeminalno jedro, GRJ – gigantocelularno retikularno jedro, DG – dentatni girus, CA3 – *Cornus Ammonis* region 3 hipokampusu, CA1 - *Cornus Ammonis* region 1 hipokampusu.

kao i u CA3 i CA1 regionima i dentatnom girusu hipokampusa ALS životinja (Slika 12). Međutim, najizrazitije povećanje u bojenju na glijalne markere je uočeno u facijalnom jedru (lat. *nucleus facialis*) i dentatnom girusu (lat. *gyrus dentatus*), koji su izabrani kao regioni od interesa za dalje eksperimente.

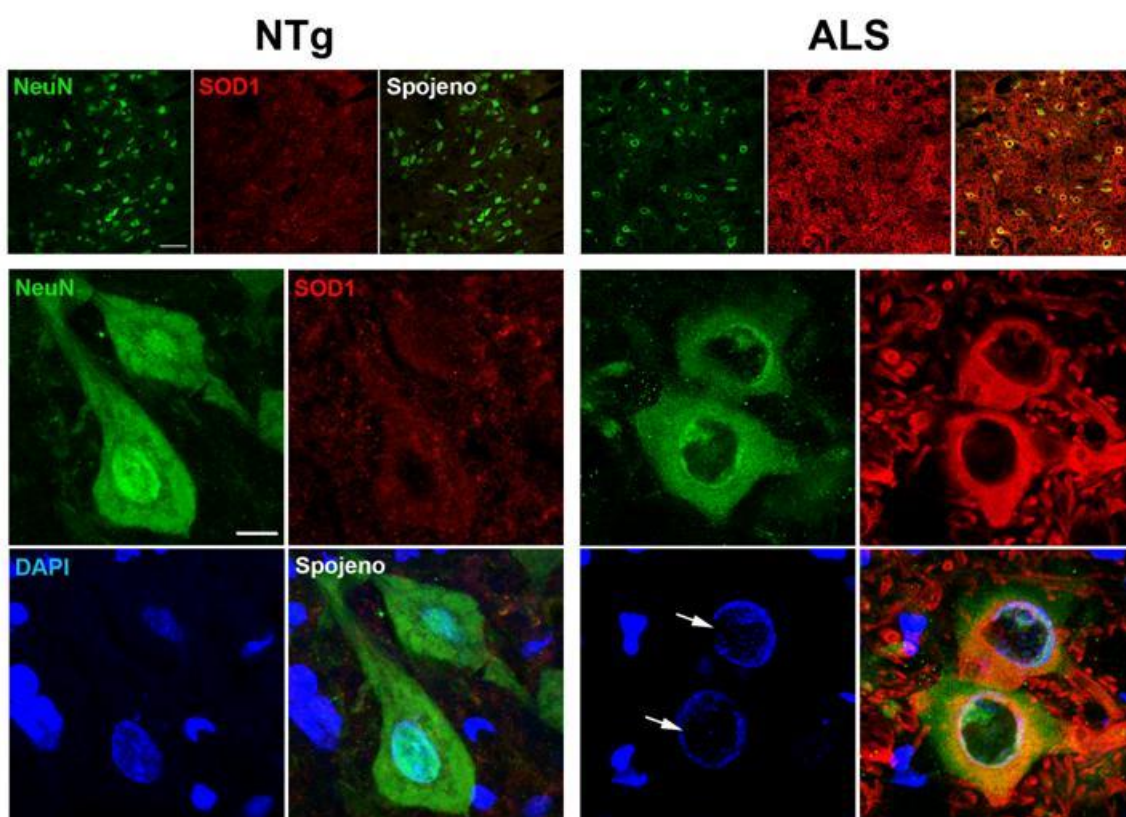
Da bi se istražili i rani znaci aktivacije i proliferacije glijalnih ćelija u facijalnom jedru i dentatnom girusu, moždani preseci u nivou moždanog stabla i hipokampusa NTg, presimptomatskih (preALS) i simptomatskih (ALS) životinja su imunohistohemijski obeleženi na GFAP i Iba1. Takođe, kako bi se ispitali količina i distribucija SOD1 proteina u tkivu, moždani preseci su obeleženi pomoću antitela koja se vezuju za ovaj enzim. Imunohistohemijsko bojenje i analiza procenta GFAP i Iba1 pozitivnih piksela na konfokalnim slikama su pokazali prisustvo povećanog bojenja na ove markere i u facijalnom jedru i u dentatnom girusu preALS životinja (Slika 13A, B, C, D, F, G), što je ukazalo na aktivaciju glijalnih ćelija u ovim regionima mozga već u ovoj ranoj fazi bolesti. Kao što je bilo očekivano, bojenja na GFAP i Iba1 su bila još izraženija u simptomatskim životinjama što je ukazivalo na proliferaciju glijalnih ćelija i prisustvo neuroinflamacije. Imunohistohemija je takođe pokazala pojačano bojenje na SOD1 protein u oba regiona mozga u preALS životinjama, sa daljim povećanjem u simptomatskoj fazi, što je potvrđeno analizom srednje vrednosti intenziteta piksela SOD1 signala na konfokalnim slikama (Slika 13A, B, E, H). Međutim, uočeni su različiti obrasci akumulacije SOD1 proteina u ova dva moždana regiona. Naime, izražena fokalna akumulacija SOD1 proteina, koja ukazuje na njegovu agregaciju u određenim tipovima ćelija, je uočena u facijalnom jedru (Slika 13A, donji red). Ova pojava je bila znatno manje izražena u dentatnom girusu, u kojem je akumulacija SOD1 proteina u tkivu pokazivala više uniforman karakter (Slika 13B, donji red).

Za dalje ispitivanje specifične ćelijske lokalizacije uočenih akumulacija SOD1 proteina, preseci moždanog stabla i hipokampusa NTg i simptomatskih ALS životinja su obojeni na SOD1, NeuN kao marker neurona, i DAPI kao marker jedarnog materijala. Analiza obeleženih preseka je pokazala smanjeno bojenje na NeuN u moždanom stablu ALS životinja, što je ukazalo na prisustvo neurodegeneracije (Slika 14, gornji red).

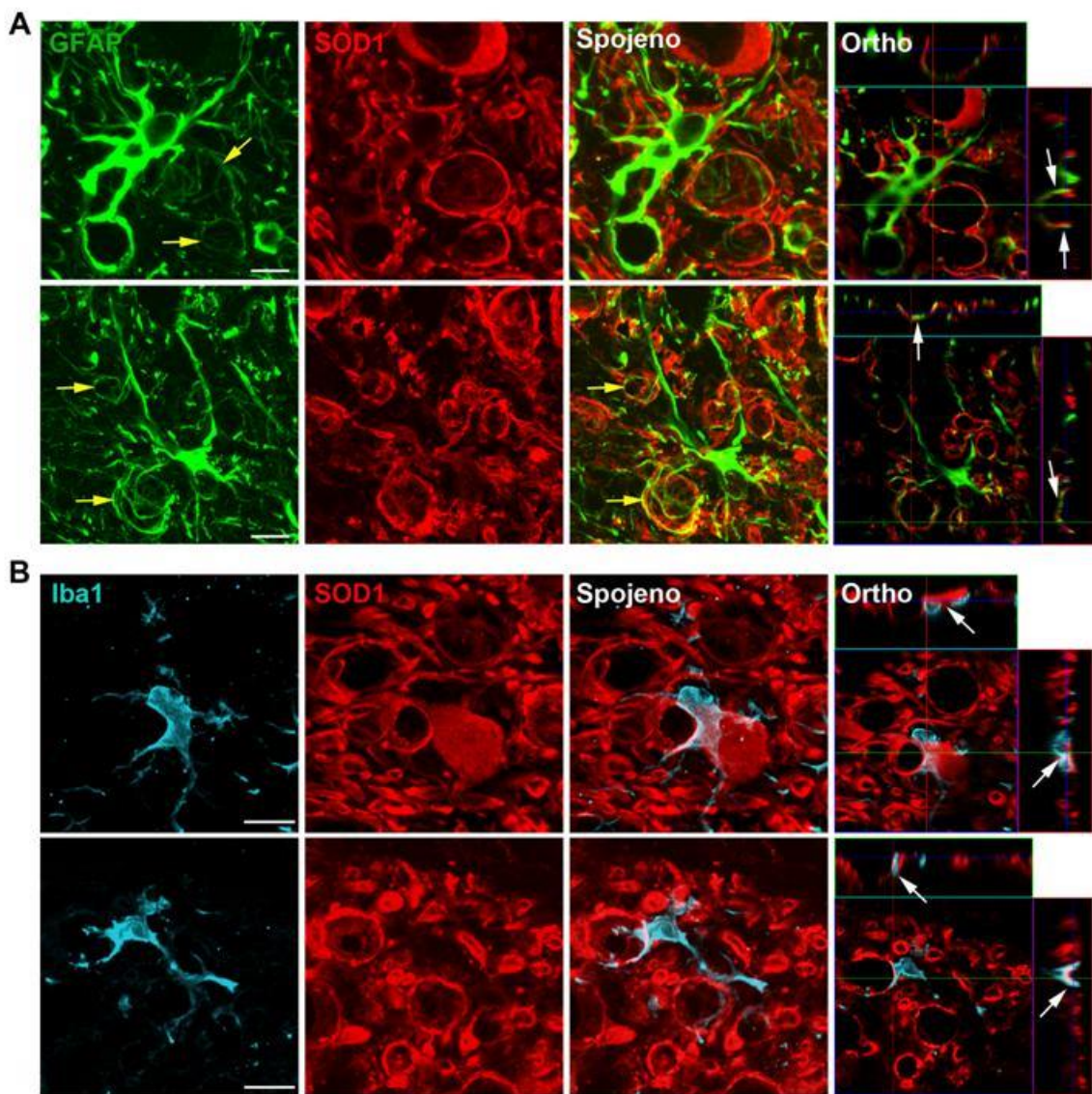


Slika 13. Proliferacija astrocita i mikroglije, i akumulacija SOD1 proteina u tkivu mozga preALS i simptomatskih - ALS pacova. Konfokalne slike imunohistochemijskog bojenja na GFAP kao marker astrocita, Iba1 kao marker mikroglije, i SOD1 protein u poprečnim preseccima facijalnog jedra (A) i dentatnog girusa (B) moždanog tkiva NTg, preALS i simptomatskih (ALS) životinja. Skala iznosi 100 μ m. Grafici prikazuju kvantifikaciju procenta GFAP pozitivnih (C i F) ili Iba1 pozitivnih (D i G) piksela, odnosno srednju vrednost intenziteta piksela SOD1 signala (E i H) na konfokalnim slikama facijanog jedra (C, D i E) i dentatnog girusa (F, G i H). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. $n = 16 - 20$ slika po grupi. Jednofaktorska analiza varijanse sa Bonferroni *post-hoc* testom (C, D, F i G), ili Kruskal Wallis analiza varijanse na rankovima sa Dunn-Bonferroni *post-hoc* testom (E i H). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Snimci napravljeni na većem uvećanju su osim izražene akumulacije SOD1 proteina u citoplazmi neurona moždanog stabla ALS životinja pokazali i prisustvo razgradnje jedarnog materijala u ovim ćelijama (Slika 14, srednji i donji red, označeno belim strelicama). Međutim, uočene akumulacije SOD1 proteina nisu bile isključivo intraneuronalne, već su bile prisutne i van ovih ćelija. S druge strane, degeneracija neurona i intraneuronalne akumulacije SOD1 proteina nisu uočene u dentatnom girusu ALS životinja (nije prikazano).



Slika 14. Unutarćelijska akumulacija SOD1 proteina i degeneracija jedra u neuronima moždanog stabla simptomatskih ALS životinja. Konfokalne slike dvostrukog imunohistohemijskog bojenja na SOD1 protein i NeuN kao marker neurona, kao i na jedarni materijal DAPI bojom u poprečnim presecima facijalnog jedra moždanog tkiva NTg (levo) i ALS (desno) životinja. Skala iznosi 100 μm (gornji red slika) i 10 μm (središnji i donji red slika). Na slikama se može uočiti izrazita akumulacija SOD1 proteina u citoplazmi, kao i degeneracija jedarnog materijala (bele strelice) u neuronima moždanog stabla ALS životinja.



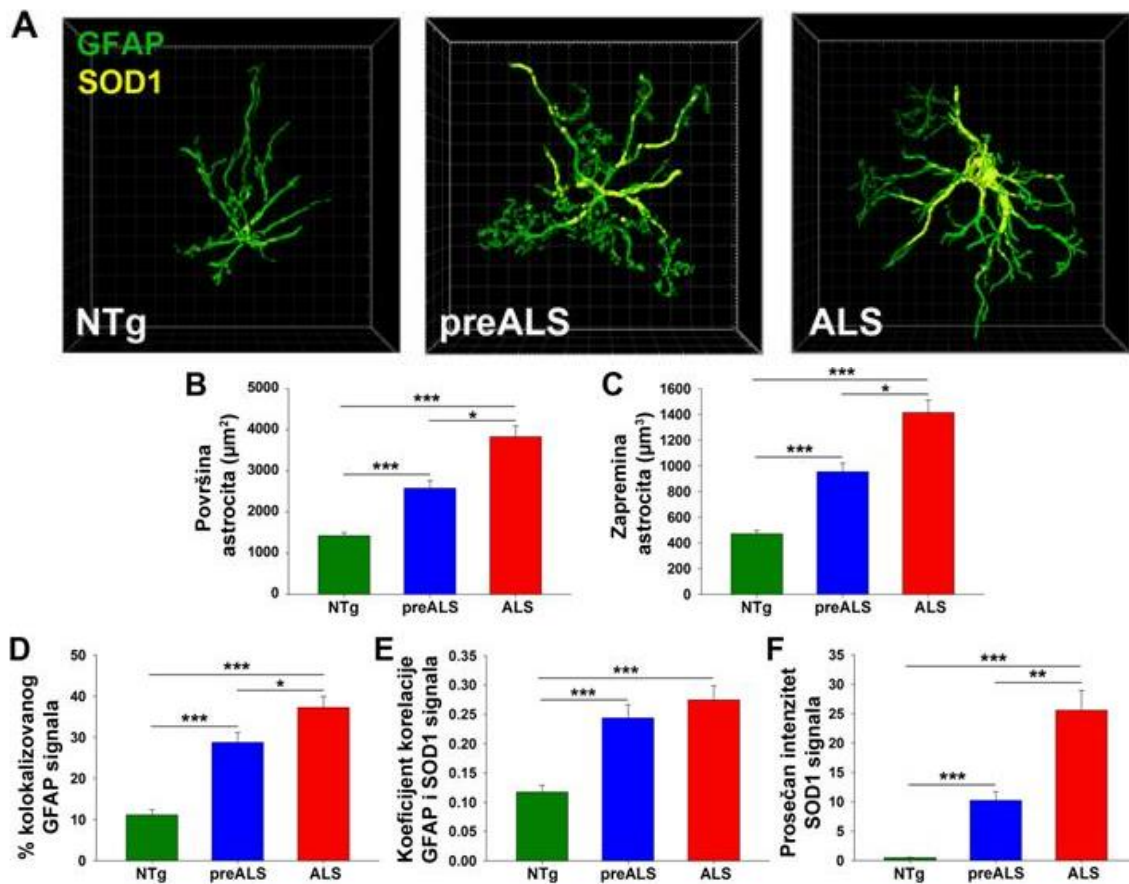
Slika 15. Interakcije između glijalnih ćelija i nakupina SOD1 proteina i tkivu moždanog stabla ALS životinja. Konfokalne slike dvostukog imunohistochemijskog bojenja na SOD1 protein i GFAP kao marker astrocita (A) ili Iba1 kao marker mikroglije (B) u poprečnim presecima facijalnog jedra moždanog tkiva ALS životinja. Skala iznosi 10 μm . Na slikama se mogu uočiti specifične strukture ćelijskih nastavaka astrocita koje nalikuju korpama (obeležene žutim strelicama), kao i bliske interakcije ćelijskih nastavaka astrocita i mikroglije sa SOD1 nakupinama (obeleženo belim strelicama). Ortho – ortogonalne projekcije trodimenzionalnih konfokalnih snimaka.

Kako bi se ispitalo da li su astrociti i/ili mikroglijalne ćelije dodatna žarišta za unutarćelijsku akumulaciju SOD1 proteina, tkivni preseki moždanog stabla ALS životinja su imunohistochemijski obojeni na GFAP, Iba1 i SOD1 protein. Bojenje je otkrilo prisustvo hipertrofiranih astrocita u facijalnom jedru ALS pacova, sa specifičnim korpastim strukturama ćelijskih nastavaka (Slika 15A, žute strelice) kojima obavijaju

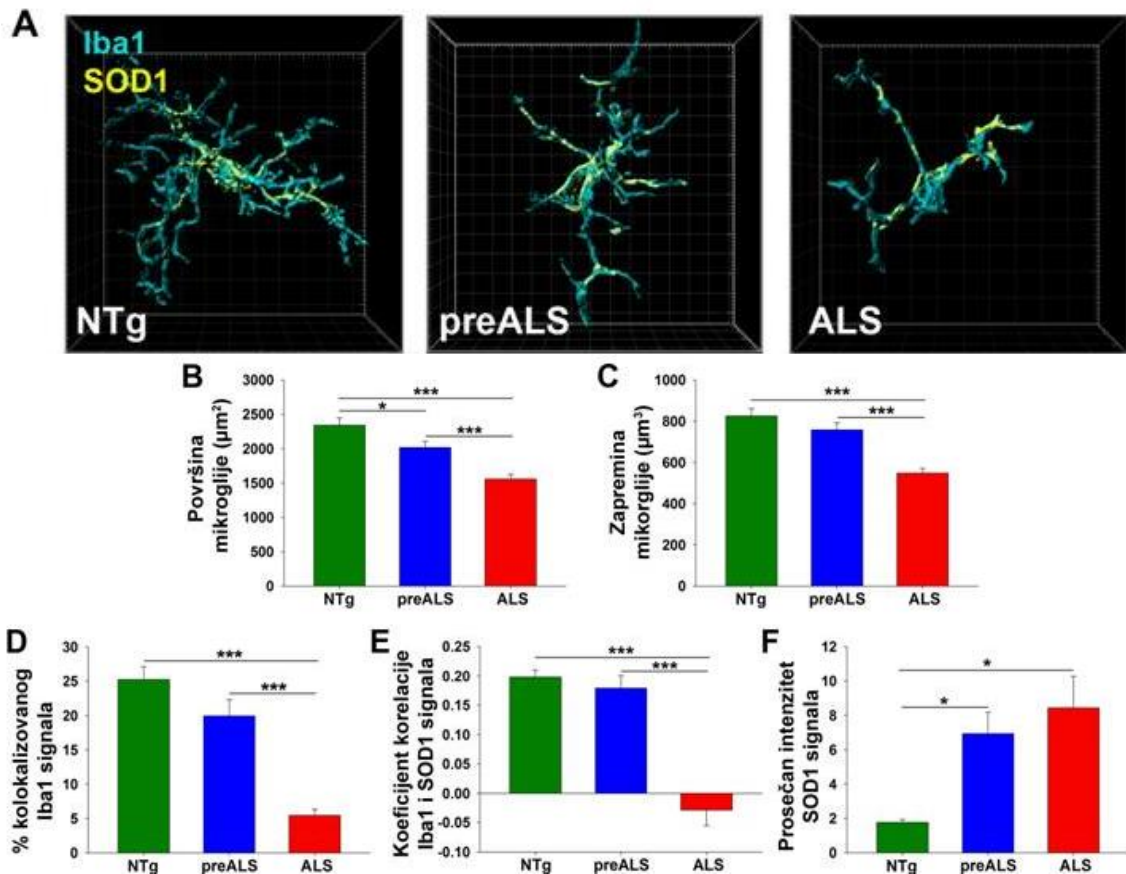
globularne strukture specifične na SOD1 (Slika 15A, bele strelice). Po veličini i obrascu akumulacije SOD1 proteina ove globularne strukture su odgovarala neuronima moždanog stabla opisanim na Slici 14. Takođe, mikroglialne ćelije u facijalnom jedru ALS životinja su posedovale ameboidnu morfologiju koja se karakterisala uvećanim ćelijskim telom, kao i kratkim a širokim ćelijskim nastavcima (Slika 15B) koji su takođe uspostavljali bliske kontakte sa globularnim strukturama specifičnim na SOD1 protein (Slika 15B, bele strelice).

Analiza konfokalnih 3D slika pojedinačnih glijalnih ćelija u facijalnom jedru

Za detaljnije ispitivanje morfologije astrocita i mikroglije, kao i stepena akumulacije SOD1 proteina u ovim ćelijama, urađena je analiza konfokalnih 3D snimaka pojedinačnih ćelija iz tkivnih preseka facijalnog jedra i dentatnog girusa NTg, preALS i simptomatskih ALS životinja koji su prethodno imunohistohemijski obeleženi na SOD1 protein i GFAP odnosno Iba1. Rekonstrukcija površinskih 3D modela GFAP signala, napravljenih pomoću IMARIS programa, je pokazala izmenjenu morfologiju astrocita u facijalnom jedru preALS i ALS u poređenju sa NTg životinjama (Slika 16A, zeleni signal). Ovo je dodatno potvrđeno kvantitativnom analizom morfoloških parametara koja je pokazala povećanu površinu i zapreminu ovih ćelija već u presimptomatskoj fazi, uz dalje povećanje u ALS životinjama (Slika 16B, C). Količina unutarćelijskog SOD1 signala je takođe bila povećana u preALS u poređenju sa NTg životinjama, uz dodatno povećanje u ALS pacovima, što je pokazano kako rekonstrukcijom modela kolokalizovanog unutarćelijskog SOD1 signala pomoću IMARIS programa (Slika 16A, žuti signal), tako i analizom procenta kolokalizovanih piksela GFAP i SOD1 signala i njihovog Pirsonovog koeficijenta korelacije (Slika 16D, E). Signal poreklom od SOD1 proteina je bio relativno uniformno raspoređen u ćelijskom telu i nastavcima astrocita iz NTg životinja, dok je u astrocitima iz preALS i ALS pacova SOD1 protein bio fokalno raspoređen skoro isključivo u ćelijskom telu i proksimalnim nastavcima (Slika 16A). Intenzitet kolokalizovanog SOD1 signala je bio povišen kod preALS u poređenju sa astrocitima iz NTg životinja, uz dalje povećanje intenziteta u astrocitima iz ALS životinja (Slika 16F), što je ukazivalo na progresivno formiranje unutarćelijskih nakupina ovog proteina.



Slika 16. Aktivacija astrocита i akumulacija SOD1 proteina u ovim ćelijama u facijalnom jedru preALS i simptomatskih - ALS životinja. Trodimenzionalne rekonstrukcije astrocита i unutarćelijskog SOD1 proteina napravljene u IMARIS programu na osnovu konfokalnih snimaka dvostrukog imunohistohemijskog bojenja na SOD1 protein i GFAP kao marker astrocита u poprečnim presecima facijalnog jedra moždanog tkiva NTg, preALS i simptomatskih ALS životinja (A). Grafici prikazuju srednju vrednost površine (B) i zapremine (C) pojedinačnih astrocита, prosečni procenat GFAP pozitivnih pikseli koji kolokalizuju sa SOD1 pozitivnim pikselima (D), prosečnu vrednost Pirsonovog koeficijenta korelacije između SOD1 i GFAP signala (E), kao i prosečni intenzitet signala kolokalizovanih SOD1 pozitivnih pikseli. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. $n = 36 - 40$ snimaka po grupi. Jednofaktorska analiza varijanse sa Bonferroni *post-hoc* testom (D i E), ili Kruskal Wallis analiza varijanse na rangovima sa Dunn-Bonferroni *post-hoc* testom (B, C i F). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



Slika 17. Aktivacija mikroglije u facijalnom jedru ALS životinja. Trodimenzionalne rekonstrukcije mikroglijalnih ćelija i unutarćelijskog SOD1 proteina napravljene u IMARIS programu na osnovu konfokalnih snimaka dvostrukog imunohistohemijskog bojenja na SOD1 protein i Iba1 marker mikroglije u poprečnim presecima facijalnog jedra moždanog tkiva NTg, preALS i simptomatskih ALS životinja (A). Grafici prikazuju srednju vrednost površine (B) i zapremine (C) pojedinačnih mikroglijalnih ćelija, prosečni procenat Iba1 pozitivnih piksela koji kolokalizuju sa SOD1 pozitivnim pikselima (D), prosečnu vrednost Pirsonovog koeficijenta korelacije između SOD1 i Iba1 signala (E), kao i prosečni intenzitet signala kolokalizovanih SOD1 pozitivnih piksela. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. $n = 36 - 40$ snimaka po grupi. Jednofaktorska analiza varijanse sa Bonferroni *post-hoc* testom (B i C), ili Kruskal Wallis analiza varijanse na rangovima sa Dunn-Bonferroni *post-hoc* testom (D, E i F). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

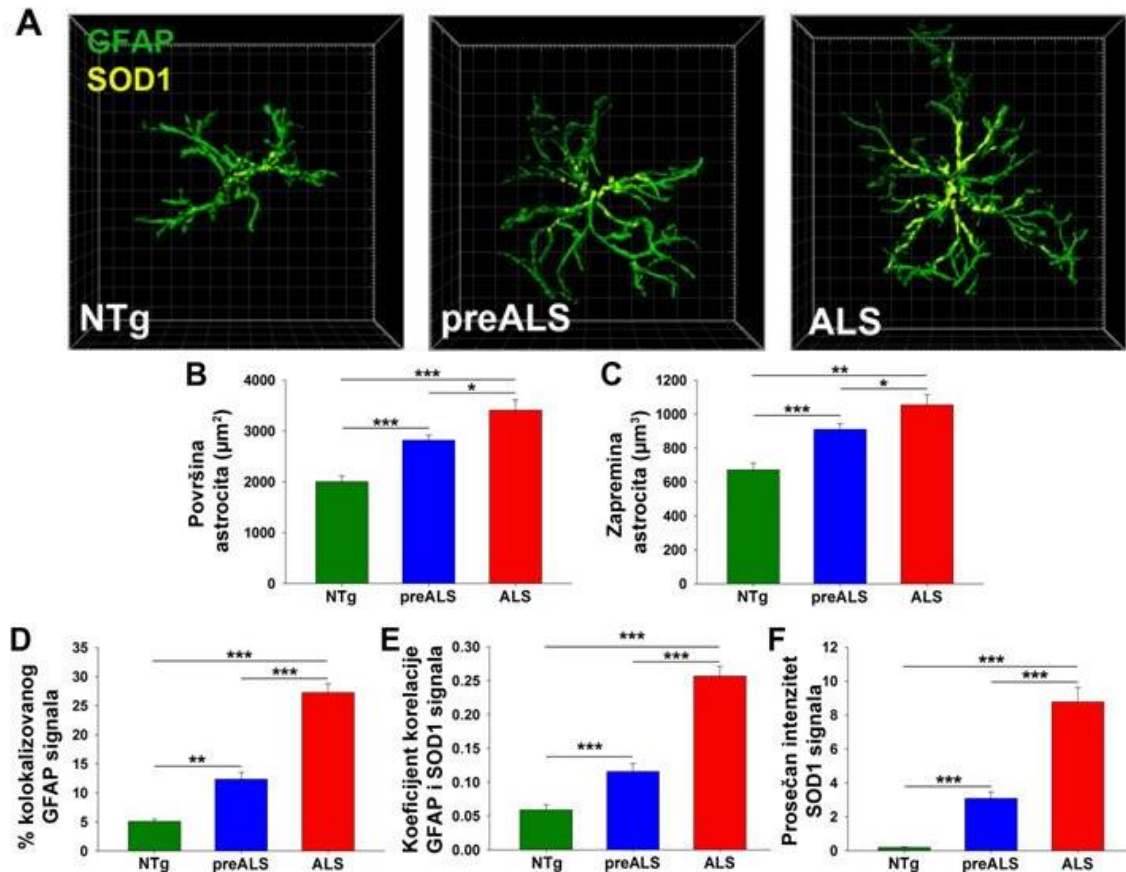
Rekonstrukcija 3D modela Iba1 signala je pokazala neaktiviranu razgranatu morfologiju mikroglijalnih ćelija u facijalnom jedru NTg životinja (Slika 17A, plavi signal). Slična morfologija mikroglije je uočena i u preALS životinjama, dok su u simptomatskim – ALS životinjama ove ćelije imale ameboidnu morfologiju sa malim brojem ćelijskih nastavaka (Slika 17A). Analiza morfoloških parametara je pokazala blago smanjenje ćelijske površine mikroglije u preALS u poređenju sa NTg životinjama, dok je smanjenje ćelijske površine bilo znatno izraženije u simptomatskoj

fazi (Slika 17B). Promena u ćelijskoj zapremini nije uočena kod preALS životinja, dok je ovaj parametar bio značajno smanjen kod mikroglije iz ALS pacova (Slika 17C). Za razliku od astrocita, mikroglija u facijalnom jedru nije pokazala unutarćelijsku akumulaciju SOD1 proteina. Umesto toga, količina unutarćelijskog SOD1 signala je bila malo, ali ne značajno, umanjena u preALS u poređenju sa NTg životinjama, sa izrazitim smanjenjem kod simptomatskih - ALS pacova (Slika 17D, E).

Obrazac unutarćelijske distribucije SOD1 proteina je bio sličan u mikrogliji iz NTg i preALS životinja, sa ravnomernim rasporedom ovog proteina u ćelijskom telu i nastavcima (Slika 17A, žuti signal). Sa druge strane, mikroglija iz simptomatskih ALS životinja je pokazala potpuno izmenjen obrazac unutarćelijske distribucije SOD1 proteina koji je u ovim ćelijama bio lociran skoro isključivo u ćelijskim nastavcima (Slika 17A, žuti signal). Intenzitet kolokalizovanog SOD1 signala je bio povišen u mikrogliji iz preALS i ALS životinja, ali se nije razlikovao između ove dve grupe životinja (Slika 17F). Takođe, intenzitet kolokalizovanog SOD1 signala je bio značajno manji u mikrogliji iz facijalnog jedra u poređenju sa astrocitima iz istog regiona moždanog stabla (uporediti Slike 16F i 17F). Ovi rezultati su ukazali na odsustvo akumulacije SOD1 proteina u ovom tipu glijalnih ćelija facijalnog jedra.

Analiza konfokalnih 3D slika pojedinačnih glijalnih ćelija u dentatnom girusu

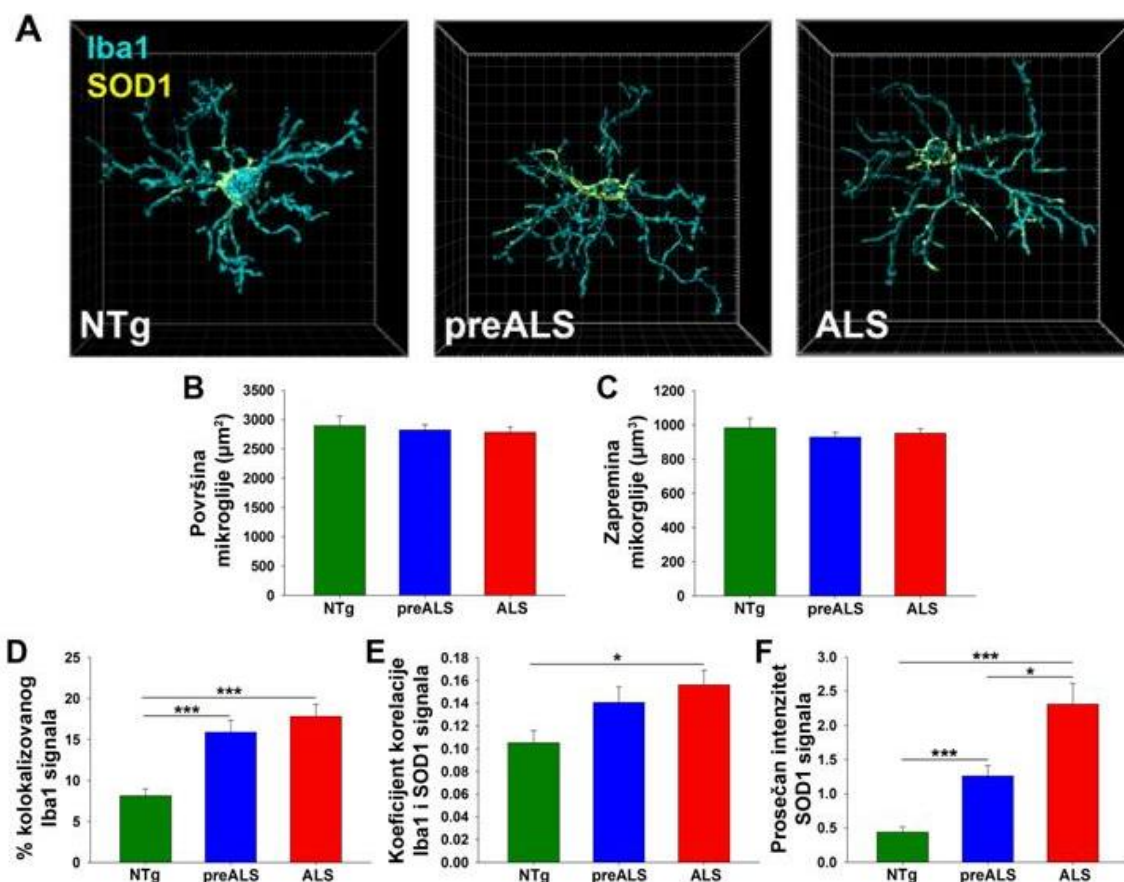
Analiza 3D rekonstrukcija GFAP signala sa konfokalnih snimaka dentatnog girusa je pokazala skoro identičan obrazac promena u svim ispitivanim parametrima kao onaj uočenom u facijalnom jedru (uporediti Slike 16 i 18). Naime, u dentanom girusu astrociti su pokazali progresivno povećanje veličine ćelijskog tela i složenosti ćelijskih nastavaka u preALS i ALS životinjama (Slika 18A, zeleni signal), što je potvrđeno porastom ćelijske površine i zapremine u ove dve eksperimentalne grupe (Slika 18B, C). Slične promene su uočene i za procenat kolokalizovanih piksela SOD1 i GFAP signala, Pirsonov koeficijent korelacije i intenzitet unutarćelijskog (kolokalizovanog) SOD1 signala, sa progresivnim povećanjem ovih parametara u preALS i simptomatskim ALS pacovima (Slika 18D, E, F).



Slika 18. Aktivacija astrocita i akumulacija SOD1 proteina u ovim ćelijama u dentatnom girusu preALS i simptomatskih - ALS životinja. Trodimenzionalne rekonstrukcije astrocita i unutarćelijskog SOD1 proteina napravljene u IMARIS programu na osnovu konfokalnih snimaka dvostrukog imunohistohemijskog bojenja na SOD1 protein i GFAP kao marker astrocita u poprečnim presecima dentatnog girusa moždanog tkiva NTg, preALS i simptomatskih ALS životinja (A). Grafici prikazuju srednju vrednost površine (B) i zapremine (C) pojedinačnih astrocita, prosečni procenat GFAP pozitivnih piksela koji kolokalizuju sa SOD1 pozitivnim pikselima (D), prosečnu vrednost Pirsonovog koeficijenta korelacije između SOD1 i GFAP signala (E), kao i prosečni intenzitet signala kolokalizovanih SOD1 pozitivnih piksela. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. $n = 36 - 40$ snimaka po grupi. Kruskal Wallis analiza varijanse na rangovima sa Dunn-Bonferroni *post-hoc* testom. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Treba istaći da je intenzitet unutarćelijskog SOD1 signala bio znatno niži u poređenju sa ovim parametrom kod astrocita iz facijalnog jedra (uporediti Slike 16F i 18F), što je u saglasnosti sa histološkim rezultatima ove studije koji su pokazali slabije bojenje na SOD1 protein u hipokampusu (Slika 13B, E, H). S druge strane, promene u unutarćelijskoj distribuciji SOD1 proteina su pokazale blago izmenjen obrazac, sa ravnomernom distribucijom u astrocitima iz NTg životinja, manje uniformnom

distribucijom u preALS životinjama, i fokalnom distribucijom u ćelijskom telu i proksimalnim nastavcima u simptomatskim ALS životinjama (Slika 18A, žuti signal).



Slika 19. Odsustvo aktivacije mikroglije u dentatnom girusu pre ALS i simptomatskih - ALS životinja. Trodimenzionalne rekonstrukcije mikroglijalnih ćelija i unutarćelijskog SOD1 proteina napravljene u IMARIS programu na osnovu konfokalnih snimaka dvostrukog imunohistohemijskog bojenja na SOD1 protein i Iba1 marker mikroglije u poprečnim presecima dentatnog girusa moždanog tkiva NTg, preALS i simptomatskih ALS životinja (A). Grafici prikazuju srednju vrednost površine (B) i zapremine (C) pojedinačnih mikroglijalnih ćelija, prosečni procenat Iba1 pozitivnih piksela koji kolokalizuju sa SOD1 pozitivnim pikselima (D), prosečnu vrednost Pirsonovog koeficijenta korelacije između SOD1 i Iba1 signala (E), kao i prosečni intenzitet signala kolokalizovanih SOD1 pozitivnih piksela. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška. n = 36 – 40 snimaka po grupi. Jednofaktorska analiza varijanse sa Bonferroni *post-hoc* testom (D i E), ili Kruskal Wallis analiza varijanse na rankovima sa Dunn-Bonferroni *post-hoc* testom (B, C i F). * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

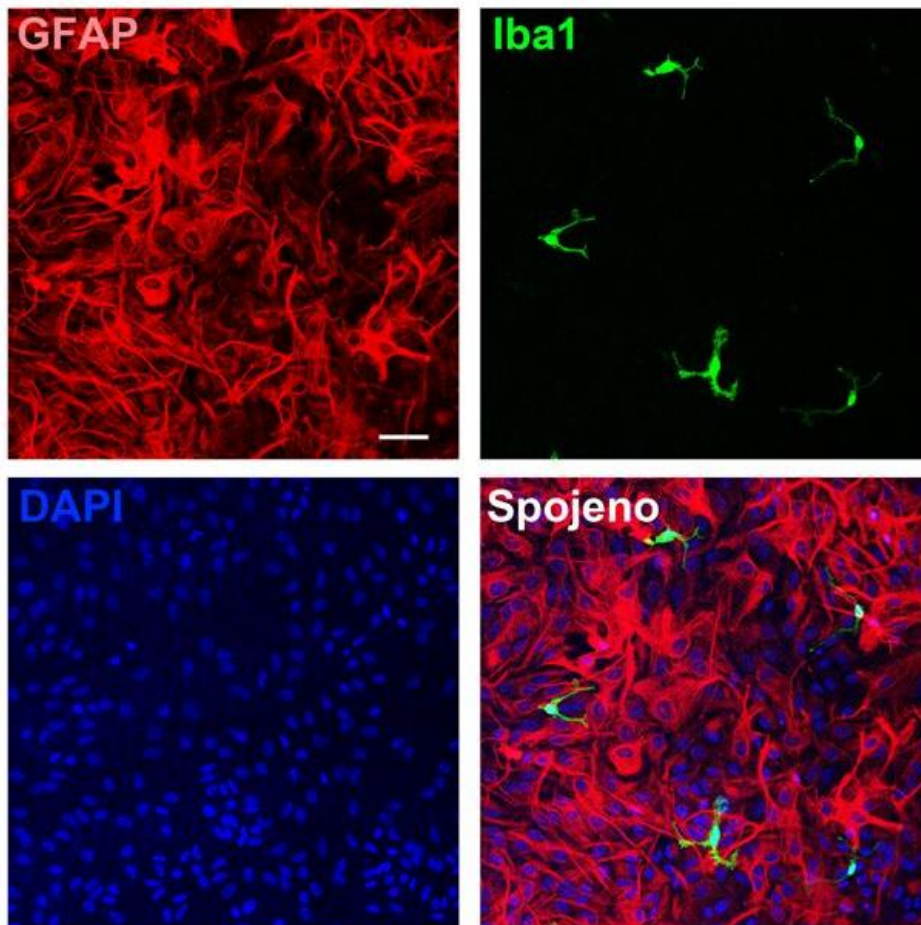
Iako je u ovoj studiji uočeno povećano bojenje na Iba1 u dentatnom girusu preALS i ALS životinja (Slika 13B, G), analiza 3D rekonstrukcija Iba1 signala iz tkivnih preseka dentatnog girusa je pokazala istu neaktiviranu razgranatu morfologiju mikroglijalnih ćelija u NTg, preALS i ALS životinjama (Slika 19A, plavi signal), bez

razlika u ćelijskoj površini i zapremini među ove tri eksperimentalne grupe (Slika 19B, C). Procenat kolokalizovanih piksela SOD1 i Iba1 signala, kao i njihov Pirsonov koeficijent korelacije su pokazali izmenjen obrazac promena u odnosu na mikrogliju iz facijalnog jedra (uporediti Slike 17D i 19D), sa nižim vrednostima ova dva parametra u NTg životinjama i skoro podjednakim povećanjem u preALS i ALS pacovima. Unutarćelijska distribucija SOD1 u mikrogliji iz dentatnog girusa je bila ravnomerna i skoro identična u sve tri eksperimentalne grupe (Slika 19A, žuti signal). Intenzitet unutarćelijskog SOD1 signala je bio značajno niži u poređenju sa astrocitima iz istog regiona hipokampusa (uporediti Slike 18F i 19F) i mikroglijom iz facijalnog jedra (uporediti Slike 17F i 19F), ali je ipak pokazao progresivno povećanje u preALS i ALS životinjama.

Ispitivanje unutarćelijske organizacije i funkcionalnih karakteristika astrocita izolovanih iz ALS pacova

Potvrda čistoće kulture kortikalnih astrocita

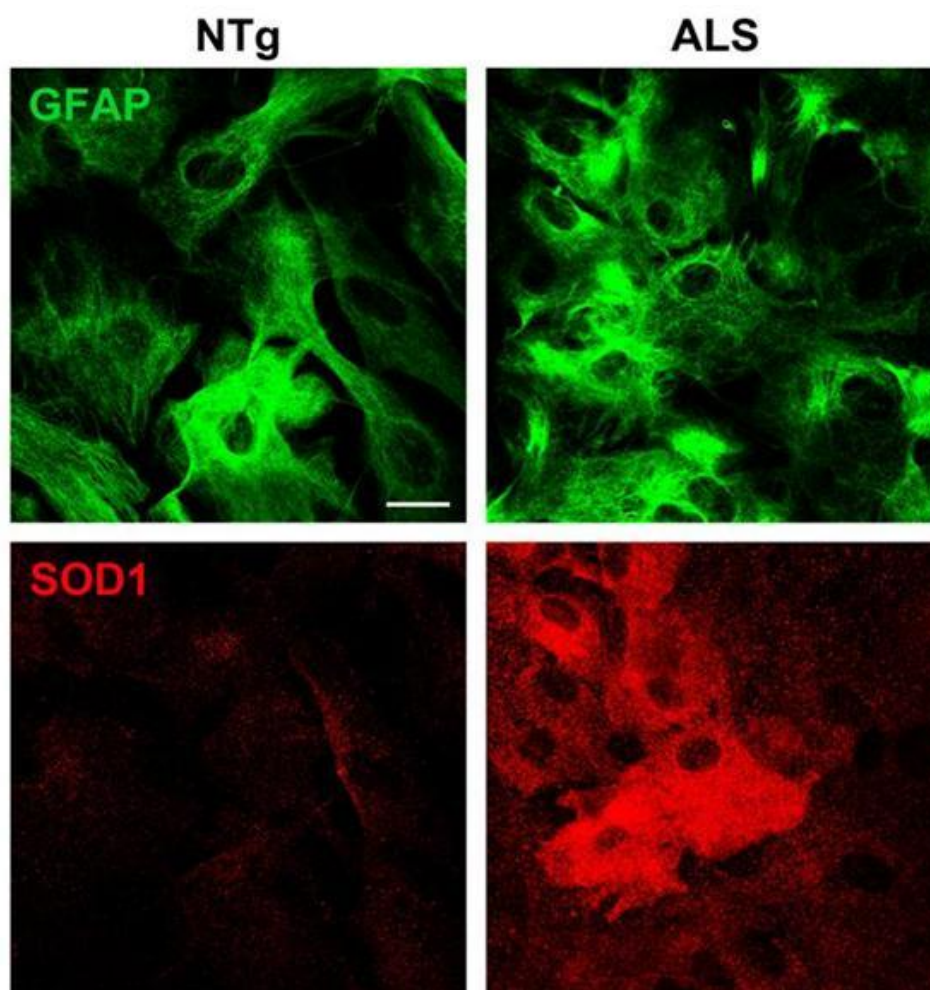
Kako bi se ispitala čistoća primarne kulture kortikalnih astrocita ćelije zasejane na mikroskopska stakla su imunocitohemijski obojena na GFAP kao marker astrocita i Iba1 kao marker mikroglije, dok je jedarni materijal obeležen DAPI bojom. Obojene ćelije su snimljene na konfokalnom laserskom skenirajućem mikroskopu, i konfokalne slike su pokazale visoku čistoću izolovane kulture sa procenjenim udelom astrocita od 95 – 97% (Slika 20).



Slika 20. Potvrda čistoće kulture astrocita. Konfokalni snimak primarne kulture kortikalnih astrocita izolovanih iz NTg životinje imunohistochemijski obojene na GFAP i Iba1 glijalne markere i jedarni materijal sa DAPI bojom. Skala iznosi 50 μm .

Ispitivanje ekspresije SOD1 proteina u astrocitima u kulturi

Pošto je analiza imunohistochemijskog bojenja prethodno pokazala unutarćelijsku akumulaciju SOD1 proteina u astrocitima u tkivu facijalnog jedra i dentatnog girusa preALS i simptomatskih ALS životinja, urađeno je ispitivanje ekspresije ovog proteina u primarnim kulturama astrocita izolovanim iz NTg i simptomatskih ALS životinja. Zasejane ćelije su imunocitochemijski obojene na GFAP kao marker astrocita i SOD1 protein, i potom snimljene na konfokalnom laserskom skenirajućem mikroskopu. Konfokalni snimci su pokazali intenzivnije bojenje na SOD1 protein u astrocitima izolovanim iz ALS životinja, pri čemu povećanje ekspresije ovog proteina nije bilo homogeno već izraženije u određenim populacijama ćelija (Slika 21).

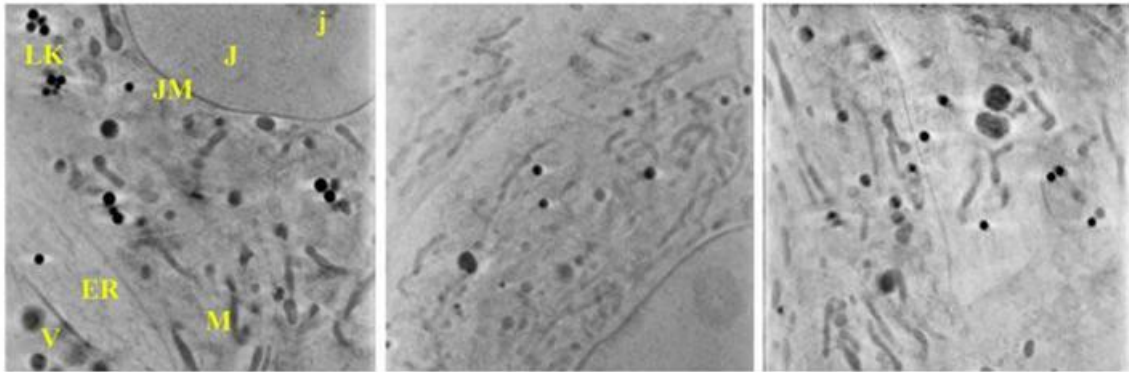


Slika 21. Povećana ekspresija SOD1 proteina u ALS astrocitima u kulturi. Konfokalni snimci primarne kulture kortikalnih astrocita izolovanih iz NTg i simptomatskih ALS životinja imunocitohemijski obojene na GFAP i SOD1 protein. Skala iznosi 20 μm . Na slikama se jasno uočava povećana ekspresija SOD1 proteina u astrocitima iz ALS životinja.

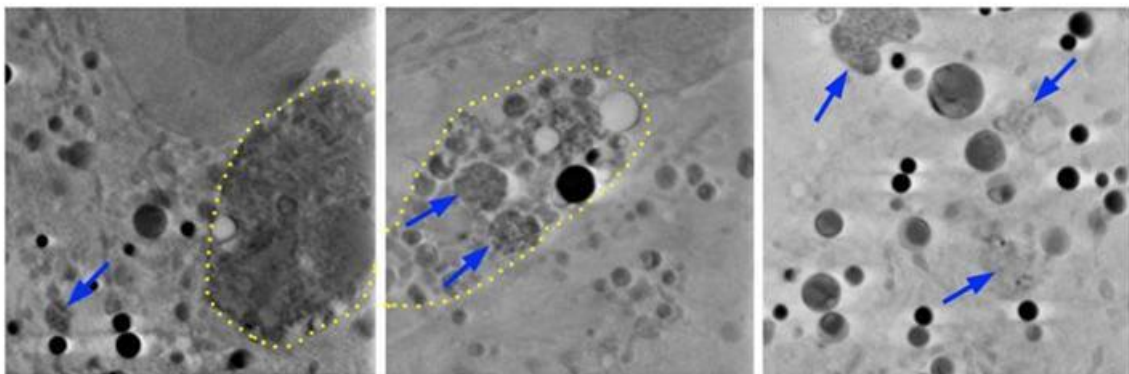
Ispitivanje unutarćelijske strukture astrocita izolovanih iz ALS životinja

Uočena akumulacija SOD1 proteina u astrocitima ALS životinja u tkivu i u kulturi je ukazala na potencijalno formiranje unutarćelijskih agregata ovog proteina koji mogu da dovedu do značajnih promena unutarćelijske strukture. Iz tog razloga astrociti iz primarnih kultura izolovanih iz NTg i simptomatskih ALS životinja su snimljeni pomoću mikroskopije Rentgenskim zračenjem niskih energija, koja je u apsorpcionom kontrastu ugljenikovih jedinjenja dala slike unutarćelijske strukture i organizacije snimanih astrocita (Slika 22).

NTg



ALS



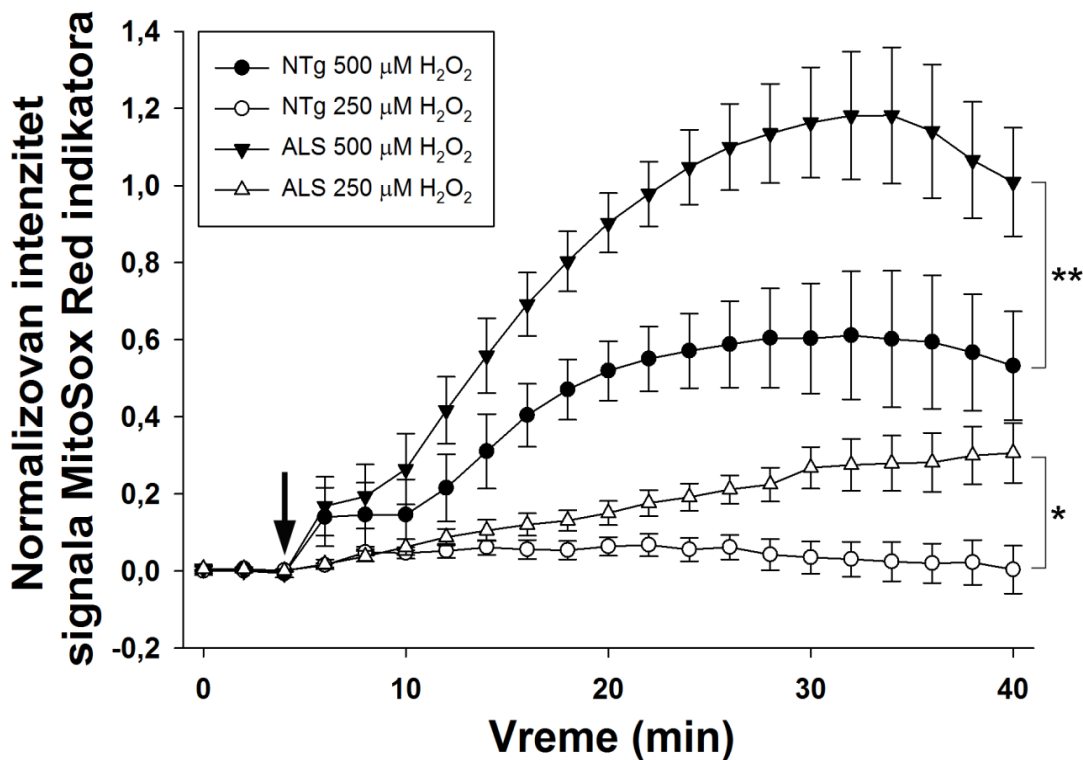
Slika 22. Izmenjena unutarćelijska struktura ALS astrocita. Slike strukture citoplazme astrocita u kulturi izolovanih iz NTg (gornji red) i ALS (donji red) životinja napravljene pomoću rekonstrukcije tomograma, snimljenih mikroskopijom Rentgenskim zračenjem niskih energija, $E = 520 \text{ eV}$. Plave strelice označavaju specifične nakupine unutarćelijskog materijala u astrocitima iz ALS životinja koje ukazuju na formiranje agregata SOD1 proteina, dok isprekidane žute linije obeležavaju složene multivezikularne strukture koje su se uočavale u neposrednoj blizini jedra ovih ćelija. J – ćelijsko jedro, j – jedarce, JM – jedarna membrana, M – mitohondrije, V – vezikule, LK – lipidne kapi, ER – endoplazmatski retikulum. Dimenzije slika su $10 \times 10 \mu\text{m}$.

Slike su pokazale deo složene strukture citoplazme astrocita iz NTg životinja neposredno uz ćelijsko jedro u kojoj su se mogle uočiti brojne lipidne kapi, mitohondrije, endoplazmatski retikulum i vezikularne strukture različitog tipa (Slika 22, gornji red). Astrociti izolovani iz ALS životinja su, pak, pokazali značajno izmenjenu unutarćelijsku strukturu koja se karakterisala prisustvom citoplazmatskih vezikula povećanog promera, specifičnim nakupinama unutarćelijskog materijala nepravilnog oblika (Slika 22, donji red, plave strelice) koje su ukazivale na moguće formiranje agregata SOD1 proteina, kao i složenim multivezikularnim strukturama u blizini ćelijskog jedra (Slika 22, donji red, oivičeno žutom isprekidanom linijom) koje

su se sastojale iz vezikula različitog tipa i prethodno opisanih nakupina ćelijskog materijala.

Ispitivanje proizvodnje superoksidnog radikala u kulturi astrocita izolovanih iz ALS životinja

Pošto su prethodni eksperimenti pokazali promene unutarćelijske strukture astrocita izolovanih iz ALS životinja, bilo je neophodno proveriti da li pored uočenih strukturnih promena ove ćelije pokazuju poremećaje i na funkcionalnom nivou, odnosno kako one odgovoraju na prooksidativne stimulse.

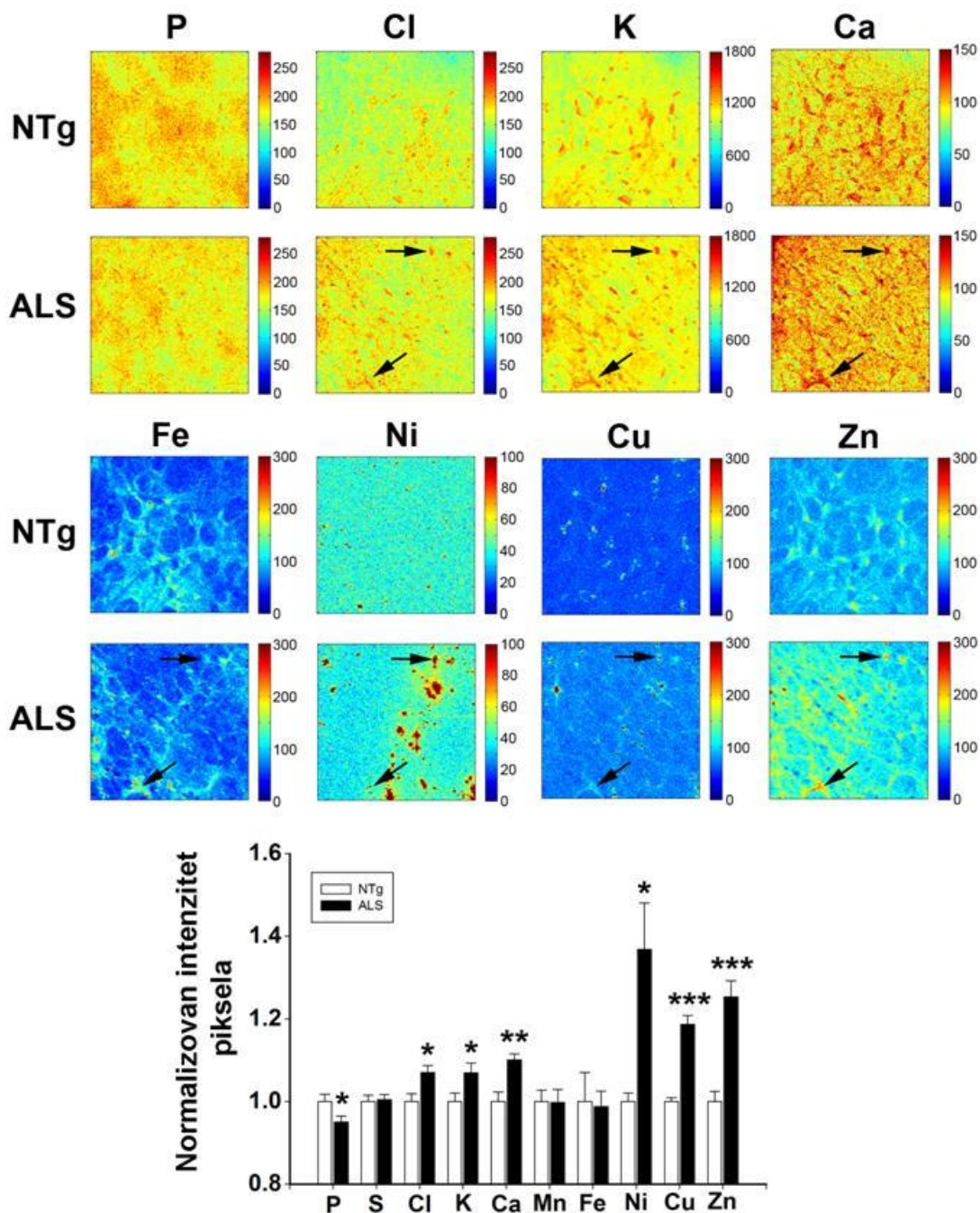


Slika 23. Povećana proizvodnja superoksidnog radikala u ALS astrocitima. Grafički prikaz dinamike promene fluorescencije MitoSox Red indikatora proizvodnje superoksidnog radikala u astrocitima u kulturi izolovanim iz NTg i simptomatskih ALS životinja (krugovi odnosno trouglovi) nakon stimulacije sa dve različite koncentracije vodonik-peroksida (250 i 500 μM , prazni odnosno puni simboli). Strelica na grafiku označava trenutak stimulacije vodonik-peroksidom. $n = 9$ (snimci po grupi; po 3 snimka iz 3 različite kulture za svaku grupu). Tačke na grafiku predstavljaju srednju vrednost \pm standardna greška. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Iz tog razloga analizirana je proizvodnja superoksidnog radikala u astrocitima u kulturi izolovanim iz NTg i simptomatskih ALS životinja, praćenjem promene fluorescencije MitoSox Red indikatora u vremenu nakon tretmana ćelija vodonik-peroksidom na konfokalnom laserskom skenirajućem mikroskopu. Analiza vremenskih serija je pokazala povećanu proizvodnju superoksidnog radikala u astrocitima izolovanim iz ALS u odnosu na astrocite izolovane iz NTg životinja nakon stimulacije se dve koncentracije vodonik-peroksida (250 i 500 μM). Dinamika proizvodnje ovog radikala se razlikovala u zavisnosti od primenjene koncentracije vodonik-peroksida (Slika 23). Takođe, stimulacija sa nižom koncentracijom vodonik-peroksida (250 μM) nije dovela do značajnog odgovora kod astrocita izolovanih iz NTg životinja, dok su astrociti iz ALS životinja i u ovom slučaju pokazali povećanu produkciju superoksidnog radikala.

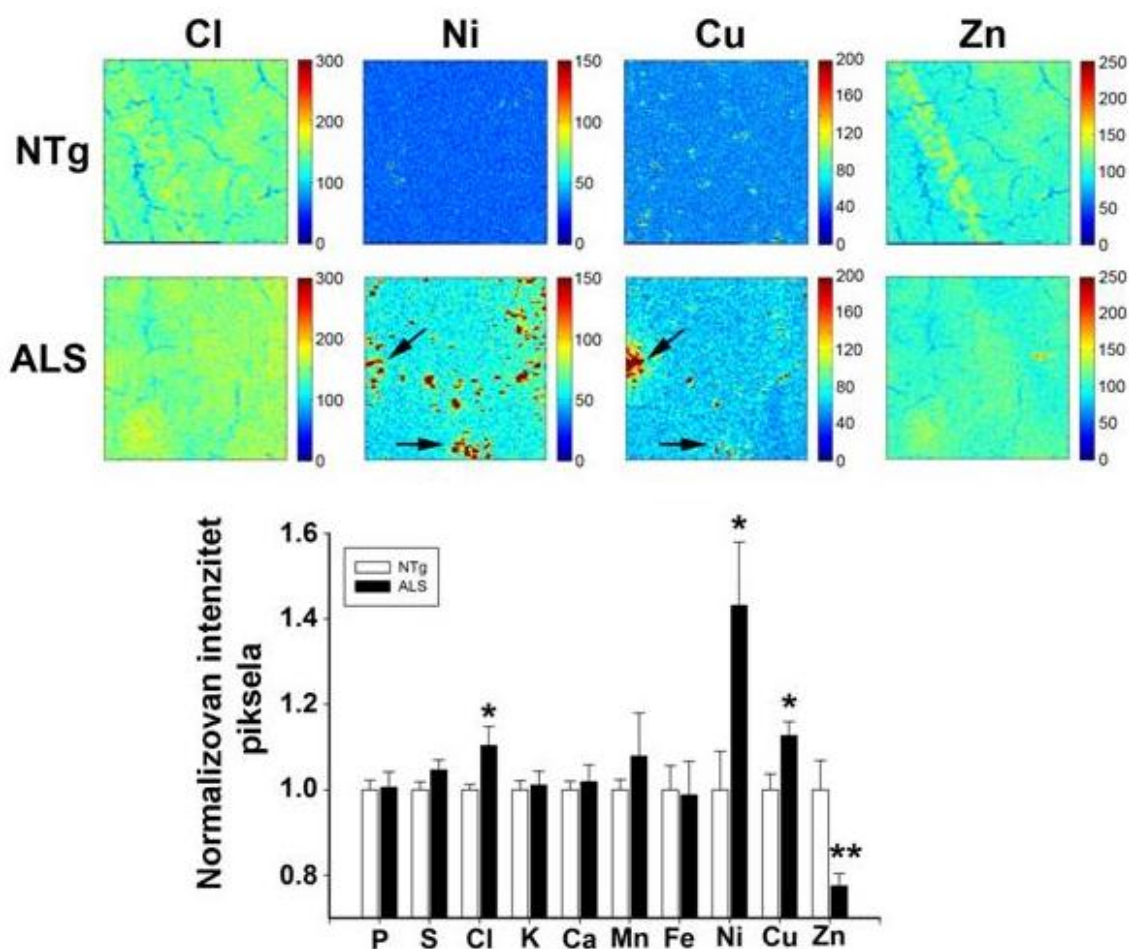
Ispitivanje koncentracije hemijskih elementata u tkivu facijalnog jedra i dentatnog girusa simptomatskih hSOD1 G93A pacova

Kako unutarćelijski jonski sadržaj ima veliki uticaj na oblik i morofologiju ćelije, ali i na moguću agregaciju proteina, i pošto je SOD1 enzim funkcionalan samo ukoliko su Cu i Zn prisutni u njegovom aktivnom centru, bilo je važno ispitati koncentraciju ovih kao i drugih fiziološki bitnih elemenata P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, i Ni. Pored toga, promene u koncentracijama ovih elemenata u tkivu mogu da budu odraz patoloških promena („marker”). Stoga, tkivni preseki facijalnog jedra i dentatnog girusa NTg i ALS životinja su ispitani pomoću fluorescentne mikroskopije Rentgenskim zračenjem (XRF). Analiza srednje vrednosti intenziteta signala na XRF slikama, koja odgovara količini merenog elementa u tkivu, je pokazala značajno smanjenje u koncentraciji za P ($5,0 \pm 2,0$ %), i povećanje koncentracija za Cl ($7,0 \pm 2,5$ %), K ($7,0 \pm 3,0$ %), Ca ($10,0 \pm 2,6$ %), Ni ($36,8 \pm 13,6$ %), Cu ($18,7 \pm 2,6$ %) i Zn ($25,3 \pm 4,6$ %) u facijalnom jedru ALS životinja (Slika 24).



Slika 24. Promene u distribuciji i količini različitih elemenata u facijalnom jedru simptomatskih - ALS životinja. Slike distribucije P, Cl, K, Ca, Fe, Ni, Cu i Zn dobijene su pomoću fluorescentne mikroskopije Rentgenskim zračenjem ($E = 9,8 \text{ keV}$, dimenzije slika $200 \times 200 \mu\text{m}$) na tkivnim presecima facijalnog jedra NTg i ALS životinja. Boje na skalama odgovaraju koncentracijama elemenata u opsegu izraženom u arbitrarnim jedinicama za svaku sliku. Na slikama se mogu uočiti fokalne nakupine različitih elemenata (označeno crnim strelicama) u tkivu facijalnog jedra ALS životinja koje najverovatnije odgovaraju određenim populacijama ćelija. Grafik prikazuje srednju vrednost intenziteta piksela za svaki element normalizovanu u odnosu na prosečnu vrednost intenziteta piksela na slikama NTg životinja za odgovarajući element. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. $n = 7$ slika po grupi. Studentov t test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Analiza srednje vrednosti intenziteta signala na XRF slikama tkiva dentatnog girusa je, kao i u moždanom stablu, pokazala značajno povećanje u koncentracijama za Cl ($10,4 \pm 4,6 \%$), Ni ($43,1 \pm 17,4 \%$) i Cu ($12,7 \pm 4,9 \%$) u ALS životinjama, dok je koncentracija Zn bila smanjena ($-22,4 \pm 7,4 \%$; Slika 25). Takođe, promene u koncentracijama za određene elemente su pokazivale fokalni karakter u oba ispitivana moždana regiona ALS životinja, što je ukazivalo na akumulaciju ovih elemenata u specifičnim populacijama ćelija (Slika 24 i Slika 25, označeno crnim strelicama).



Slika 25. Promene u distribuciji i količini različitih elemenata u dentatnom girusu simptomatskih - ALS životinja. Slike distribucije Cl, Ni, Cu i Zn dobijene su pomoću fluorescentne mikroskopije Rentgenskim zračenjem ($E = 9,8 \text{ keV}$, dimenzije slika $200 \times 200 \mu\text{m}$) na poprečnim presecima dentatnog girusa moždanog tkiva NTg i ALS životinja. Boje na skalama odgovaraju koncentracijama elemenata u opsegu izraženom u arbitrarnim jedinicama za svaku sliku. Na slikama se mogu uočiti fokalne nakupine Cu i Ni (označeno crnim strelicama) u tkivu dentatnog girusa ALS životinja. Grafik prikazuje srednju vrednost intenziteta piksela za svaki element normalizovanu u odnosu na prosečnu vrednost intenziteta piksela na slikama NTg životinja za odgovarajući element. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. $n = 9$ slika po grupi. Studentov t test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ispitivanje parametara oksidativnog stresa u tkivu moždanog stabla i hipokampusa presimptomatskih i simptomatskih hSOD1 G93A pacova

Kako bi se detaljnije ispitao redoks status u moždanom tkivu preALS i ALS pacova, urađeno je ispitivanje različitih parametara oksidativnog stresa i aktivnosti glavnih antioksidativnih enzima u homogenatima tkiva moždanog stabla i hipokampusa NTg, preALS i simptomatskih - ALS životinja. Analiza parametara oksidativnog stresa u homogenatima tkiva NTg životinja nije pokazala prisustvo razlika između dva ispitivana regiona mozga (Slika 26). Ovo je omogućilo da se potencijalne razlike između ova dva regiona mozga isključe kao mogući faktor varijabilnosti, dozvoljavajući njihovo međusobno poređenje kod preALS i ALS životinja.

Analiza tri različita parametra oksidativnog stresa (koncentracija nitrita, proizvodnja superoksidnog radikala i indeks lipidne peroksidacije) je pokazala značajne razlike između eksperimentalnih grupa (

Tabela 2). Naime, svi ispitivani parametri su bili povećani već u preALS u poređenju sa NTg životinjama, sa dodatnim porastom u ALS pacovima (Slika 26A, B, C). Takođe, indeks lipidne peroksidacije i proizvodnja superoksidnog radikala su bili povišeni u homogenatima moždanog stabla u poređenju sa homogenatima hipokampusa ALS životinja (Slika 26B, C), pri čemu je proizvodnja superoksidnog radikala pokazivala regionalnu razliku već u presimptomatskoj fazi (Slika 26B).

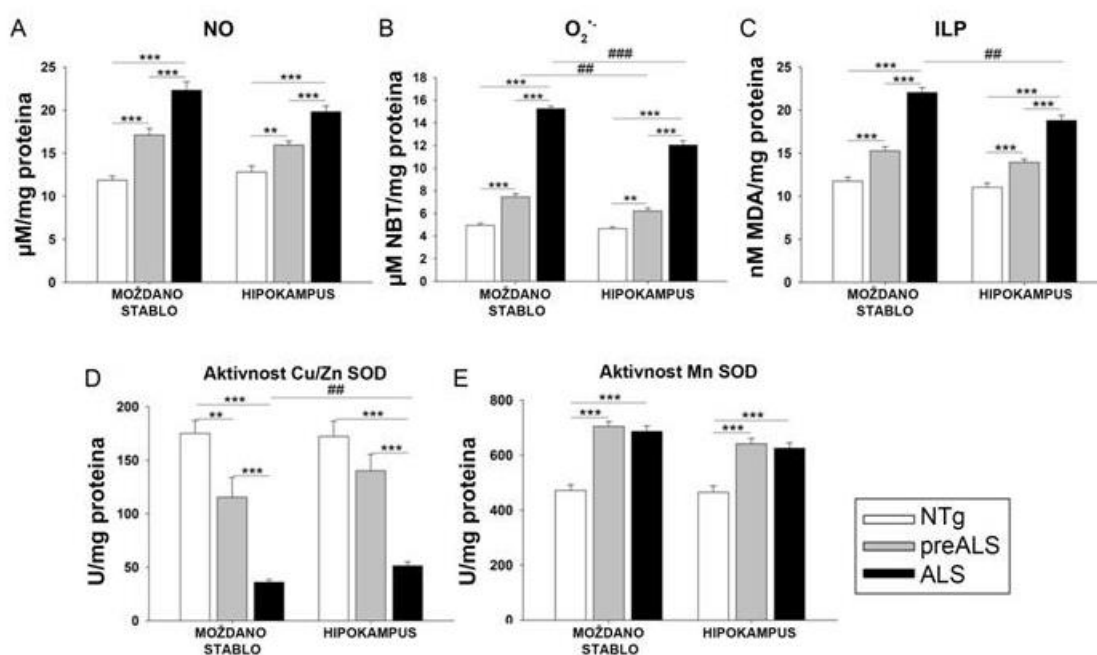
Značajne razlike su pronađene i u aktivnosti SOD1 enzima (

Tabela 2), koja je pokazivala progresivno smanjenje počevši od presimptomatske pa do simptomatske faze, dok su razlike između dva ispitivana regiona mozga bile prisutne samo u ALS životinjama (Slika 26). Sa druge strane, aktivnost SOD2 enzima je bila povećana u oba regiona mozga već u preALS životinjama i nije se menjala u simptomatskoj fazi (Slika 26).

Tabela 2. Rezultati jednofaktorske analize varijanse parametara oksidativnog stresa i aktivnosti superoksid dismutaze 1 i 2 u homogenatima tkiva moždanog stabla i hipokampusa NTg, preALS i ALS životinja.

	df	Moždano stablo		Hipokampus	
		F	p	F	p
Koncentracija nitrita	15	47,052	< 0,001	31,177	< 0,001
Proizvodnja $O_2^{\cdot-}$	15	546,894	< 0,001	189,525	< 0,001
ILP	15	109,123	< 0,001	61,274	< 0,001
Aktivnost SOD1	15	29,306	< 0,001	26,032	< 0,001
Aktivnost SOD2	15	44,229	< 0,001	20,924	< 0,001

df – stepeni slobode statističke analize



Slika 26. Biohemijski parametri oksidativnog stresa. A) Količina nitrita (NO), B) Proizvodnja superoksidnog radikala ($O_2^{\cdot-}$), C) Indeks lipidne peroksidacije (ILP), D) Aktivnost citoplazmatske superoksid dismutaze (Cu/Zn SOD), E) Aktivnost mitohondrijalne superoksid dismutaze (Mn SOD), u homogenatima tkiva moždanog stabla i hipokampusa NTg, preALS i simptomatskih - ALS pacova. n = 6 (životinje po grupi). Svaki stub na graficima predstavlja srednju vrednost ± standardna greška. * p < 0,05, ** p < 0,005, *** p < 0,001 oznake značajnih razlika između grupa u okviru istog regiona mozga (Jednofaktorska analiza varijanse sa Bonfferoni *post-hoc* testom; Tabela 2). ## p < 0,005, ### p < 0,001 oznake značajnih razlika između istih grupa u dva različita regiona mozga (Studentov t test).

Ispitivanje redoks statusa i propustljivosti krvno-moždane barijere u mozgu presimptomatskih i simptomatskih hSOD1 G93A pacova in vivo

In vitro i ex vivo redukcija nitroksida

Iako brzina redukcije nitroksida *in vivo* zavisi od različitih i mnogobrojnih faktora, karakteristike određenih redoks procesa se takođe mogu ispitati u *in vitro* i *ex vivo* uslovima gde je stopa redukcije nitroksida uglavnom uslovljena njihovom hemijskom strukturom. Iz tog razloga urađeno je nekoliko vrsta *in vitro* i *ex vivo* eksperimenata kako bi se dobili podaci koji bi omogućili pouzdanije modelovanje farmakokinetike redukcije nitroksida u *in vivo* eksperimentima.

Brzina redukcije nitroksida u prisustvu askorbata se uobičajeno koristi za ispitivanje njihove stabilnosti u prisustvu redukujućih agenasa (Vianello et al., 1995). U ovoj studiji, stope redukcije nitroksida u rastvoru sa askorbatom, kao i u svežoj krvi pacova, su izračunate na osnovu kinetičkih krivih dobijenih EPR spektroskopijom i date u Tabeli 3. Važno je istaći da su i *in vitro* redukcija nitroksida askorbatom i *ex vivo* redukcija nitroksida u krvi analizirani kao kinetički procesi pseudo-prvog reda kako bi se omogućilo jednostavnije poređenje konstanti brzine redukcije.

Rezultati su pokazali da za isti odnos koncentracija nitroksid/askorbat od 1/10, konstante brzine redukcije prate sledeći redosled: Tempol > 3CP > 3CxP. U slučaju 3CP-a, konkretan odnos koncentracija od 10:1 (0,2 mM 3CP i 0,02 mM askorbat) je bio izabran u pokušaju da se imitiraju *in vivo* uslovi, s obzirom na to da je koncentracija askorbata u cirkulišućoj krvi pacova oko 0,02 mM (Todhunter i Mc, 1946), kao i da je u ovoj studiji početna koncentracija nitroksida u cirkulaciji *in vivo* nakon njegove injekcije oko 0,2 mM. Vreme poluredukcije 3CP u ovom odnosu koncentracija je iznosilo 1390 ± 40 min, što je bilo za dva reda veličine veće od redukcije iste koncentracije 3CP *in vivo* (Tabela 4). Ovo ukazuje da drugi faktori, a ne askorbat, značajno doprinose *in vivo* redukciji 3CP, što je potvrđeno rezultatima ove studije koji su pokazali da tek 10 i 100 puta veće koncentracije askorbata u odnosu na fiziološke vrednosti (0,2 i 2 mM) daju konstante brzine redukcije 3CP slične onima u *in vivo* eksperimentima, sa vremenima poluredukcije od $18,8 \pm 0,3$ min i $11,7 \pm 0,3$ min. U

poređenju sa 3CP, redukcija 3CxP askorbatom je bila sporija, i konkretno za odnose koncentracija nitroksid/askorbat od 1/10 i 1/40 (0,02 odnosno 0,05 mM 3CxP i 2 mM askorbat) vremena poluredukcije su iznosila 170 ± 10 min i $5,7 \pm 0,2$ min. Redukcija 3CxP askorbatom je generalno bila vrlo spora, izuzev u slučaju značajno velike koncentracije askorbata (odnos koncentracija 3CxP/askorbat od 1/40). Ovi rezultati su pokazali da redukcija nitroksida askorbatom zavisi od odnosa njihovih međusobnih koncentracija, kao i da su nitroksidi koji poseduju piperidinski prsten u svojoj hemijskoj strukturi (Tempol) podložniji redukciji u odnosu na nitrokside koji poseduju pirolidinski prsten (3CP i 3CxP). Pored toga, u slučaju 3CP i 3CxP konstante brzine redukcije zavise i od funkcionalne grupe koja se nalazi nasuprot NO grupe u prstenu (CONH_2 kod 3CP nasuprot COOH kod 3CxP).

Tabela 3. Konstante brzine redukcije (k) i vremena poluredukcije ($t_{1/2}$) nitroksida u rastvoru sa različitim koncentracijama askorbata, ili u sveže izolovanoj krvi pacova, dobijene na osnovu EPR merenja. Konstante brzine redukcije su izračunate podešavanjem podataka eksponencijalnoj jednačini prvog reda. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

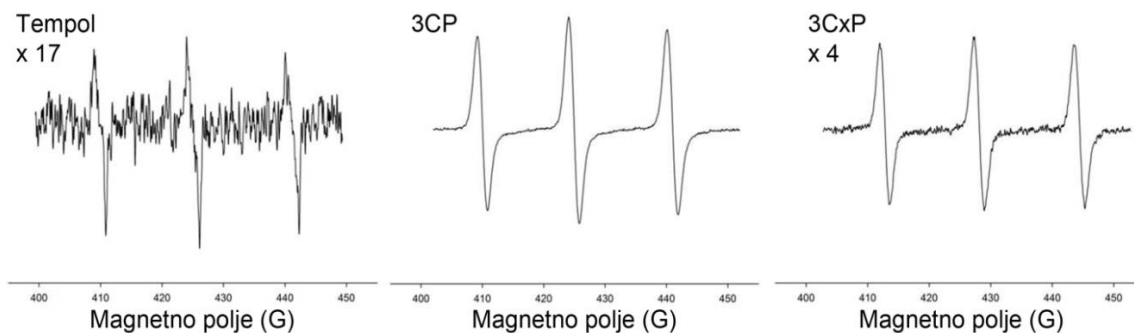
<i>In vitro</i> redukcija nitroksida askorbatom			
Nitroksid	Odnos nitroksid:askorbat	k (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
Tempol	1 : 10 (0,2 mM : 2mM)	$0,287 \pm 0,004$	$1,8 \pm 0,1$
	1 : 20 (0,1mM : 2mM)	$0,353 \pm 0,005$	$2,4 \pm 0,1$
3CP	10 : 1 (0,2mM: 0,02mM)	$0,00051 \pm 0,00005$	1390 ± 40
	1 : 1 (0,2mM : 0,2mM)	$0,0358 \pm 0,0005$	$18,8 \pm 0,3$
	1:10 (0,2mM : 2mM)	$0,059 \pm 0,002$	$11,7 \pm 0,3$
3CxP	1 : 10 (0,2mM : 2mM)	$0,0035 \pm 0,0002$	170 ± 10
	1 : 40 (0,05mM : 2mM)	$0,117 \pm 0,003$	$5,7 \pm 0,2$
<i>Ex vivo</i> redukcija nitroksida u krvi pacova			
	Koncentracija nitroksida		
Tempol	0,050 mM	$0,0660 \pm 0,0020$	$13,3 \pm 0,3$
3CP	0,050 mM	$0,0310 \pm 0,0004$	224 ± 3
3CxP	0,025 mM	$0,0017 \pm 0,0002$	408 ± 5

Kako bi se istražio doprinos drugih bioreduktanata prisutnih u krvi, redukcija Tempol-a, 3CP i 3CxP je praćena i u svežoj krvi izolovanoj iz NTg životinja (Tabela 3; Slika 29). *Ex vivo* redukcija nitroksida je pokazala eksponencijalnu kinetiku prvog reda, sa istim redosledom vremena poluredukcije kao i u slučaju redukcije askorbatom (Tempol > 3CP > 3CxP). Osim toga, 3CP i 3CxP su oba pokazali izuzetno sporu redukciju u krvi, sa vremenima poluredukcije od 224 ± 3 min i 408 ± 5 min (Tabela 3;

Slika 29), što ukazuje na vrlo mali doprinos faktora prisutnih u krvi kinetikama redukcije ovih nitroksida.

In vivo farmakokinetika nitroksida u regionu glave pacova

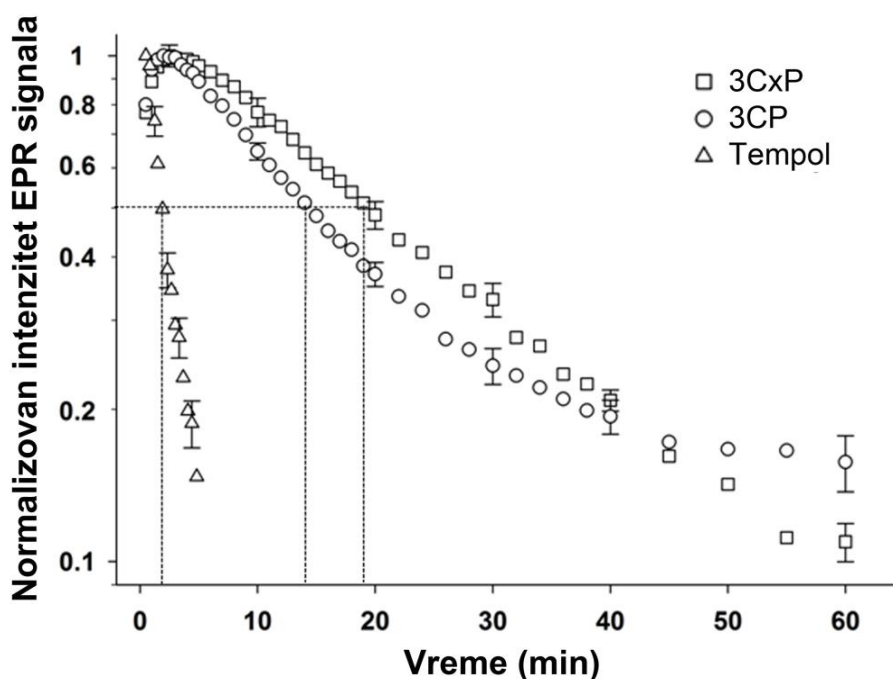
Reprezentativni EPR spektri nitroksida snimljeni u glavi pacova *in vivo* u trenutku maksimalnog intenziteta njihovog signala su prikazani na Slici 27. Odgovarajući odnosi signal/šum EPR spektara su iznosili Tempol = 3, 3CP = 78, 3CxP = 58. Ove vrednosti se mogu uzeti samo kao gruba procena relativne količine nitroksida u glavi u trenutku snimanja pošto brojni parametri mogu da utiču na EPR signal *in vivo*. Ipak, mogao se uočiti odličan odnos signal/šum za 3CP i 3CxP dobijen sa relativno kratkim vremenom akvizicije, što daje mogućnost za preciznu analizu kriva redukcije sa odgovarajućom vremenskom rezolucijom i na taj način omogućava pouzdano modelovanje kinetike redukcije. Razlika u šumu između spektara 3CP i 3CxP je bila prisutna usled različitih doza ova dva nitroksida (2 $\mu\text{mol/g}$ t.m. za 3CP i 1 $\mu\text{mol/g}$ t.m. za 3CxP), dok je šum spektra Tempol-a bio vrlo visok pošto se ovaj nitroksid brzo redukuje u drugim organima pre nego što stigne do glave, što kao rezultat ima nizak intenzitet signala odnosno nizak odnos signal/šum.



Slika 27. *In vivo* EPR spektri Tempola, 3CP-a i 3CxP-a snimljeni u regionu glave NTg pacova posle intravenozne injekcije, u trenutku maksimalnog intenziteta EPR signala nitroksida. Uveličanje spektara za Tempol i 3CxP je podešeno tako da se intenzitet njihovih signala prikaže u odnosu na intenzitet signala za 3CP.

Na Slici 28 su prikazane farmakokinetike sva tri nitroksida snimljene u regionu glave NTg životinja. Redosled brzine redukcije nitroksida je bio isti kao u *ex vivo* eksperimentima, Tempol \gg 3CP > 3CxP (uporediti Tabelu 3 i Tabelu 4). Tempol je

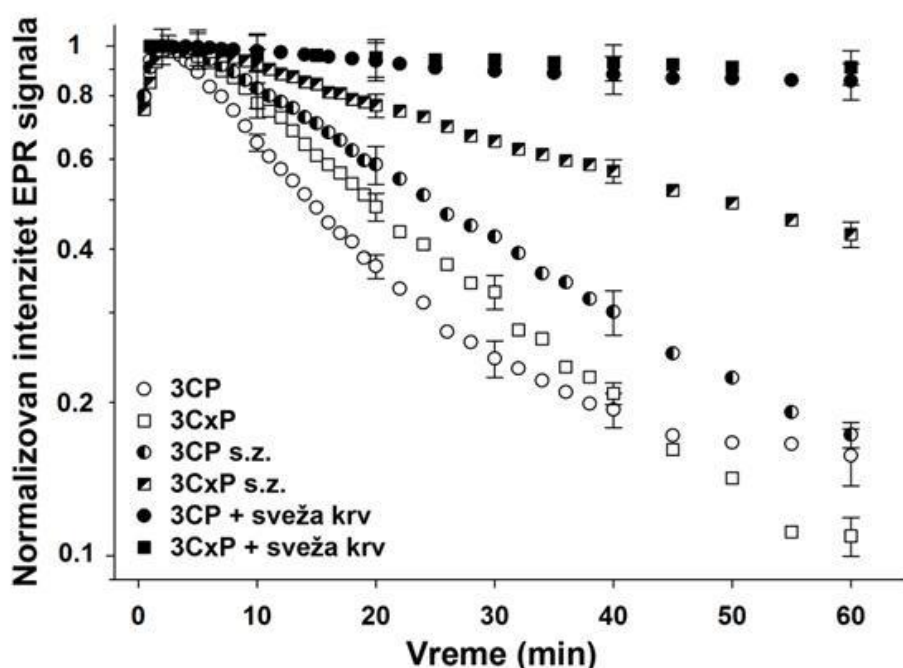
pokazao monoeksponencijalnu kinetiku, sa vrlo velikom konstantom brzine redukcije i kratkim vremenom poluredukcije od 2,0 min (Tabela 4). Sa druge strane, 3CP je nakon dostizanja maksimalne vrednosti signala pokazao izrazito odstupanje od monoeksponencijalne kinetike, sa manjom konstantom brzine redukcije u odnosu na Tempol i vremenom poluredukcije od 13,7 min. Redukciona kriva 3CxP je takođe pokazala odstupanje od monoeksponencijalne kinetike koje je ipak bilo manje izraženo u odnosu na 3CP, uz najmanju konstantu brzine redukcije i sa vremenom poluredukcije od 18,5 min.



Slika 28. Semilogaritamski zapisi redukcionih krivih EPR signala nitroksida *in vivo* snimljenih u regionu glave NTg pacova nakon injekcije Tempola (2 $\mu\text{mol/g t.m.}$), 3CP-a (2 $\mu\text{mol/g t.m.}$) ili 3CxP-a (1 $\mu\text{mol/g t.m.}$) u repnu venu. Na redukcionim krivama su prikazane srednje vrednosti i standardne varijacije iz 6 nezavisnih eksperimenata za Tempol i 3CP, odnosno 3 nezavisna eksperimenata za 3CxP. Tačkaste linije označavaju vremena poluredukcije ($t_{1/2}$).

Pošto velika brzine redukcije i loš odnos signal/šum Tempol-a nisu omogućavale detaljnu analizu kinetike redukcije koja bi mogla da razdvoji različite kinetičke događaje kao što su uklanjanje krvotokom ili distribucija među različitim odeljcima u tkivu, za dalje eksperimente su izabrani 3CP i 3CxP. Odstupanje redukcionih krivih ova dva nitroksida od monoeksponencijalne kinetike je ukazalo na postojanje više faktora sa različitim kinetičkim konstantama koji utiču na njihovu redukciju.

Kako bi se raščlanio uticaj različitih fizioloških procesa na ukupnu kinetiku redukcije signala nitroksida u glavi, doprinos uklanjanja nitroksida krvotokom je ispitan snimanjem kinetike redukcije EPR signala u odsustvu cirkulacije nakon izazivanja srčanog zastoja, što odvaja redukciju nitroksida u različitim tkivima u glavi od uklanjanja nitroksida krvotokom (Slika 29). Krive redukcije EPR signala su pokazale produženo vreme poluredukcije oba ispitivana nitroksida nakon srčanog zastoja izazvanog injekcijom rastvora KCl (Tabela 4), što je potvrdilo doprinos uklanjanja nitroksida krvotokom ukupnoj kinetici njihove redukcije.



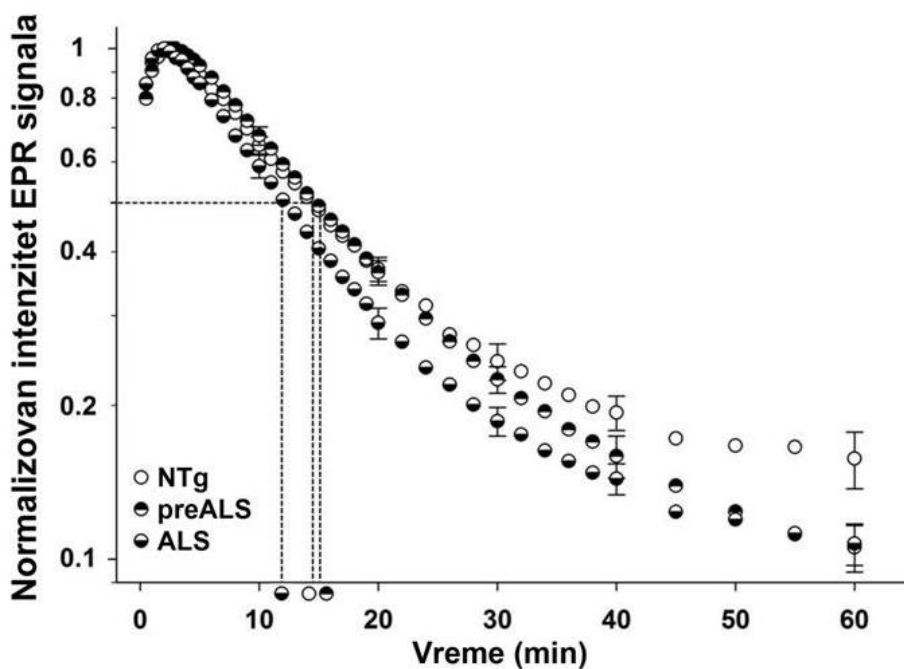
Slika 29. Redukcione krive EPR signala u regionu glave NTg životinja snimljene nakon injekcije rastvora 3CP (2 $\mu\text{mol/g t.m.}$) ili 3CxP (1 $\mu\text{mol/g t.m.}$), bez i sa injekcijom rastvora KCl 2 min nakon injekcije nitroksida kako bi se izazvao srčani zastoj (s.z.). *In vitro* kinetike redukcije 3CP i 3CxP u svežoj krvi pacova su date radi poređenja. Na redukcionim krivama su prikazane srednje vrednosti i standardne varijacije iz 6 nezavisnih eksperimenata za 3CP, 3 nezavisna eksperimenata za 3CxP, odnosno po 2 nezavisna eksperimenata za oba nitroksida u slučaju injekcije rastvora KCl.

Relativno povećanje vremena poluredukcije je iznosilo 82% za 3CP i 159% za 3CxP, što je ukazalo na veći doprinos uklanjanja nitroksida krvotokom u slučaju 3CxP, najverovatnije usled slabe prolaznosti ovog nitroksida kroz ćelijske membrane i ukidanja njegove eliminacije kroz urinarnu i fekalnu ekskreciju. Odstupanje redukcionih kriva 3CP od monoeksponencijalne kinetike kod životinja kojima je izazvan srčani zastoj je bilo manje izraženo u poređenju sa životinjama koje nisu dobile injekciju KCl,

što je potvrdilo činjenicu da su jedan ili više procesa koji doprinose ukupnoj redukciji EPR signala eliminisani iz složenog procesa eliminacije nitroksida kod živih pacova.

Tabela 4. Konstante brzine redukcije (k) i vremena poluredukcije ($t_{1/2}$) nitroksida *in vivo* u regionu glave NTg pacova sa ili bez srčanog zastoja (s.z.), kao i preALS i simptomatskih- ALS životinja. Konstante brzine redukcije su izračunate podešavanjem početnog nagiba redukcionih krivih korišćenih nitroksida monoeksponecijalnom funkcijom i predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

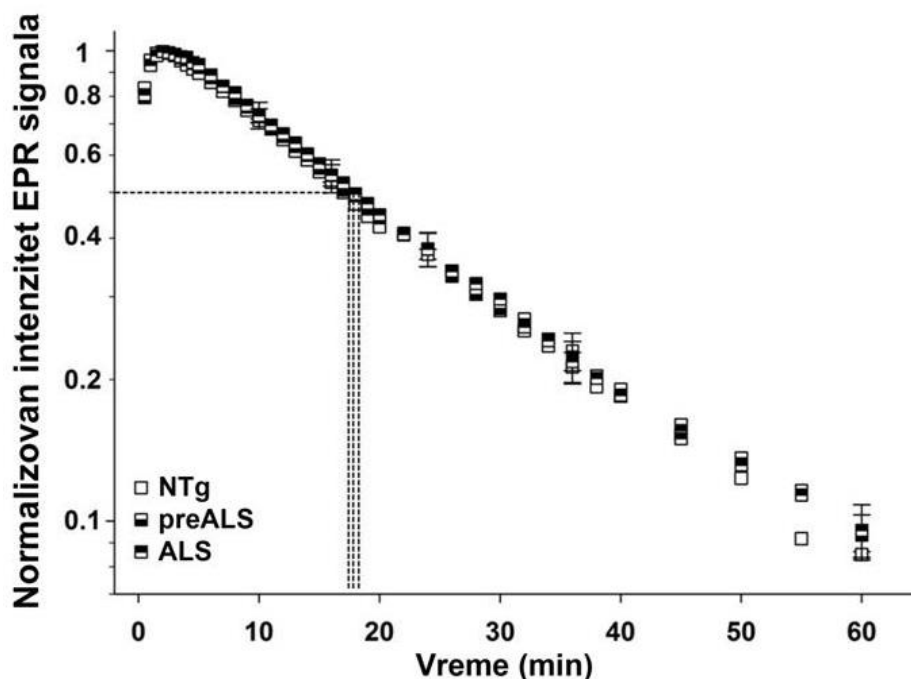
Grupe	3CP		3CxP		Tempol	
	k (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	k (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	k (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
NTg	$0,051 \pm 0,006$	$13,7 \pm 1,6$	$0,037 \pm 0,004$	$18,5 \pm 2,1$	$0,346 \pm 0,086$	$2,0 \pm 0,5$
NTg s.z.	$0,028 \pm 0,003$	$25,0 \pm 2,9$	$0,014 \pm 0,002$	$48,0 \pm 7,5$	/	/
preALS	$0,047 \pm 0,002$	$14,7 \pm 0,8$	$0,036 \pm 0,001$	$19,2 \pm 0,6$	/	/
ALS	$0,054 \pm 0,005$	$12,8 \pm 1,1$	$0,038 \pm 0,003$	$18,2 \pm 1,5$	/	/



Slika 30. Semilogaritamski prikaz redukcionih krivih 3CP ($2 \mu\text{mol/g t.m}$) snimljenih *in vivo* u regionu glave NTg, preALS i simptomatskih ALS pacova nakon injekcije nitroksida u repnu venu. $n = 6$ (životinje po grupi). Tačkaste linije označavaju vreme poluredukcije. Na zapisima su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije iz 6 nezavisnih eksperimenata.

Na Slikama 30 i 31 su prikazane redukzione krive 3CP i 3CxP snimljene u regionu glave NTg, preALS i simptomatskih - ALS životinja nakon injekcija odgovarajućeg nitroksida u repnu venu. Opšti oblik redukcionih krivih za oba nitroksida

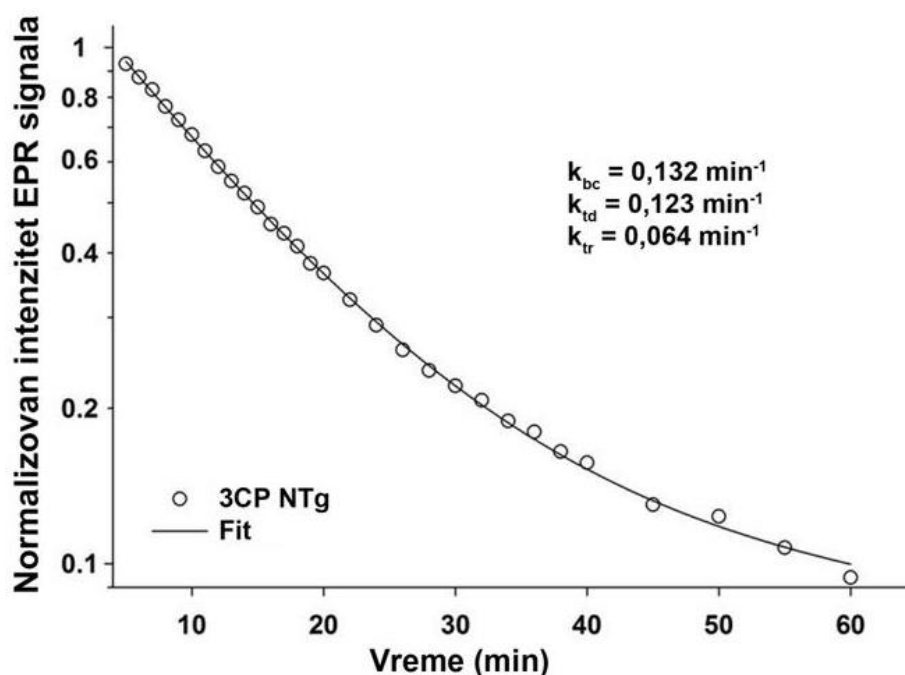
je bio vrlo sličan kod sve tri ispitivane grupe životinja, sa izraženim odstupanjem redukcionih krivih 3CP od monoeksponencijalne kinetike, i manje izraženim odstupanjem krivih 3CxP-a. Kako bi se uporedile kinetike redukcije nitroksida među različitim grupama, početni nagib na redukcionim krivama je bio podešavan monoeksponencijalnom funkcijom, uz pretpostavku da je u pitanju proces pseudo-prvog reda. Vremena poluredukcije 3CP kod ALS životinja su bila kraća od vremena poluredukcije za NTg i preALS životinje, koja se nisu međusobno razlikovala (Tabela 4). Međutim, razlike između grupa u obliku redukcionih krivih 3CP, pogotovu u kasnoj fazi redukcije, su bile znatno izraženije u odnosu na razlike između vremena poluredukcije (Slika 30). Sa druge strane, ni vremena poluredukcije ni oblici redukcionih kriva 3CxP se nisu razlikovali među tri ispitivane grupe životinja (Tabela 4, Slika 31).



Slika 31. Semilogaritamski prikaz redukcionih krivih 3CxP ($1 \mu\text{mol/g t.m}$) snimljenih *in vivo* u regionu glave NTg, preALS i simptomatskih - ALS pacova nakon injekcije nitroksida u repnu venu. $n = 3$ (životinje po grupi). Tačkaste linije označavaju vreme poluredukcije. Na zapisima su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije iz 3 nezavisna eksperimenta.

Korišćenje vremena poluredukcije za analizu i poređenje procesa koji nisu monoeksponencijalni može da pruži određeni uvid u farmakokinetiku nitroksida, ali očigledno predstavlja neadekvatan način poređenja različitih grupa životinja i definisanja procesa koji leže u osnovi kinetika redukcije. Iz tog razloga su redukcione

krive 3CP i 3CxP, dobijene snimanjem glave NTg, preALS i ALS životinja, analizirane pomoću dvo-komornog modela (Slika 32) koji uključuje uklanjanje krvotokom, distribuciju u tkivu, kao i redukciju u tkivu kao doprinos ukupnoj kinetici redukcije nitroksida.



Slika 32. Primer kinetike redukcije 3CP snimljene *in vivo* u regionu glave NTg pacova analizirane pomoću dvo-komornog modela korišćenjem jednačine opisane u poglavlju “Materijali i metode”. Vrednosti konstanti brzine redukcije za odgovarajuću životinju dobijene na osnovu ovog modela prikazane su u gornjem desnom uglu slike. k_{bc} – kinetike brzine uklanjanja krvotokom, k_{td} – kinetike brzine distribucije u tkivu, i k_{tr} – kinetike brzine redukcije u tkivu.

Statistička analiza je pokazala značajne razlike između grupa u kinetici brzine uklanjanja nitroksida krvotokom (Tabela 5, jednofaktorska analiza varijanse, $F_{(2,15)} = 9,594$, $p = 0,002$), sa povećanom k_{bc} u ALS životinjama u poređenju sa NTg ($p = 0,002$) i sa preALS pacovima ($p = 0,049$). Razlike između grupa su nađene i u kinetici brzine distribucije nitroksida u tkivu (Tabela 5, jednofaktorska analiza varijanse, $F_{(2,15)} = 5,925$, $p = 0,014$), sa većom k_{td} kod preALS ($p = 0,005$) i kod ALS ($p = 0,02$) u poređenju sa NTg životinjama. Analiza kinetike brzine redukcije nitroksida u tkivu je takođe pokazala razlike između grupa (Tabela 5, jednofaktorska analiza varijanse, $F_{(2,15)} = 3,795$, $p = 0,048$), sa većom k_{tr} kod preALS ($p = 0,024$) i kod ALS ($p = 0,038$) u poređenju sa NTg životinjama.

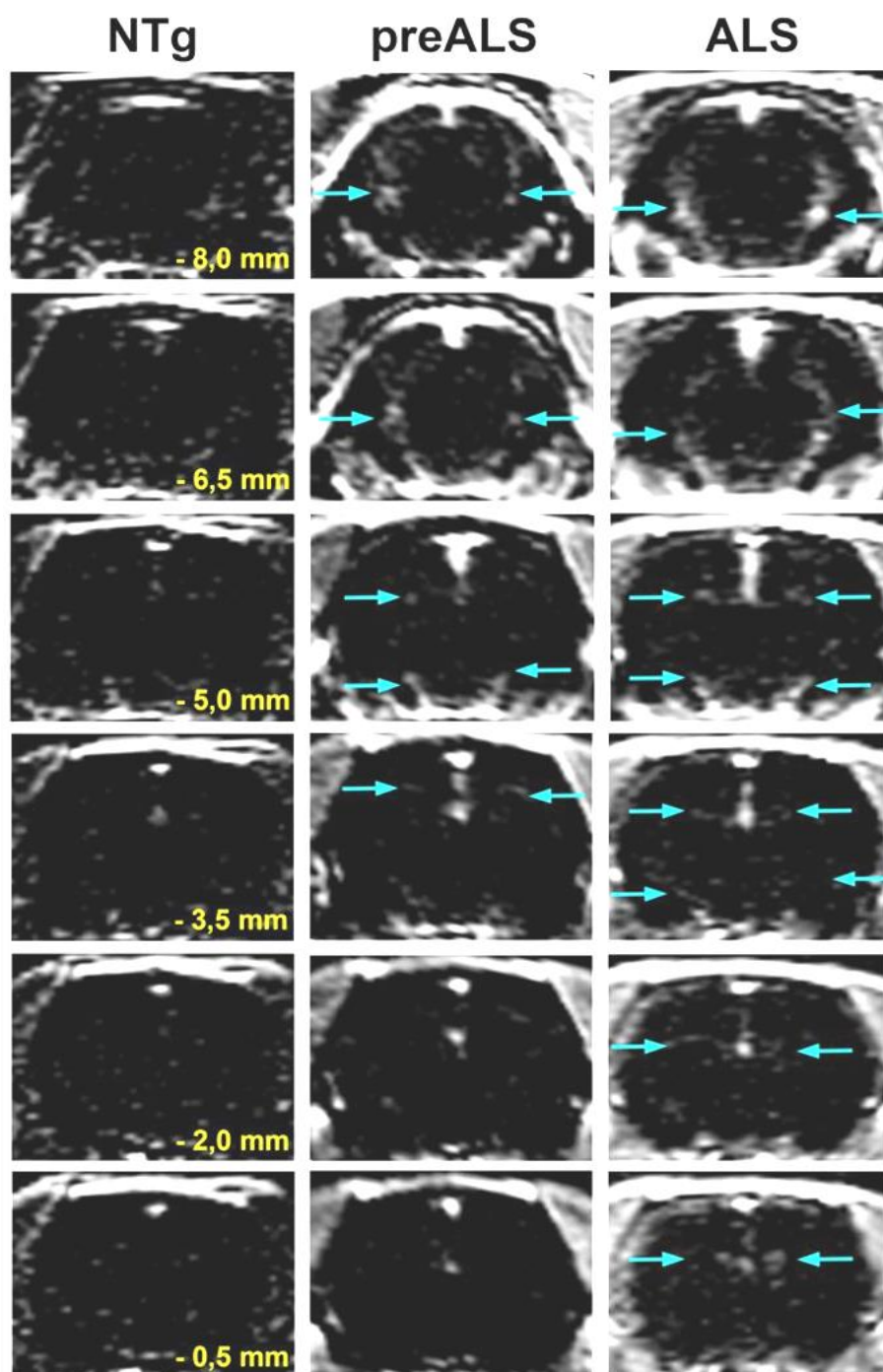
Tabela 5. Kinetike brzine redukcije 3CP i 3CxP u NTg, preALS i simptomatskim - ALS životinjama. n = 6 (životinje po grupi) za 3CP, n = 3 za 3CxP, i po 2 NTg životinje sa izazvanim srčanim zastojem (NTg s.z.) za oba nitroksida. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška. (^a p = 0,002 NTg vs ALS, ^b p = 0,049 preALS vs ALS, ^c p = 0,005 NTg vs preALS, ^d p = 0,020 NTg vs ALS, ^e p = 0,024 NTg vs preALS, ^f p = 0,038 NTg vs ALS, analiza varijanse sa Bonferroni post-hoc testom). Kinetike brzine su izračunate podešavanjem redukcionih krivih nitroksida dvo-komornom modelu. k_{bc} – kinetika brzine uklanjanja krvotokom, k_{td} – kinetika brzine distribucije u tkivu, i k_{tr} – kinetika brzine redukcije u tkivu.

Nitroksid	Grupa	k_{bc} (min ⁻¹)	k_{td} (min ⁻¹)	k_{tr} (min ⁻¹)
3CP	NTg	0,145 ± 0,010	0,147 ± 0,035	0,046 ± 0,013
	preALS	0,172 ± 0,010	0,258 ± 0,015 ^c	0,069 ± 0,002 ^e
	ALS	0,214 ± 0,013 ^{a,b}	0,236 ± 0,020 ^d	0,067 ± 0,005 ^f
	NTg c.a.	0	0,042 ± 0,004	0,089 ± 0,009
3CxP	NTg	0,083 ± 0,017	0,371 ± 0,072	0,064 ± 0,005
	preALS	0,090 ± 0,019	0,399 ± 0,161	0,064 ± 0,001
	ALS	0,091 ± 0,007	0,411 ± 0,125	0,067 ± 0,007
	NTg c.a.	0	0,019 ± 0,002	0,339 ± 0,032

MRI ispitivanje propustljivosti krvno-moždane barijere u mozgu presimptomatskih i simptomatskih hSOD1 G93A pacova

Kako bi se ispitalo stanje krvno-moždane barijere, i kako bi se potvrdili rezultati dobijeni u *in vivo* EPR eksperimentima koji su pokazali povećanu konstantu brzine distribucije nitroksida u tkivu glave preALS i simptomatskih - ALS pacova, urađeno je snimanje glave NTg, preALS i ALS životinja pomoću nuklearne magnetne rezonancije. Snimanje je urađeno T1-naglašenim protokolom pre i posle injektovanja kontrastnog agensa uz identičan položaj životinje i iste parametre snimanja. Nakon snimanja urađeno je oduzimanje signala T1 snimaka dobijenih pre i posle dodavanja kontrastnog agensa i na dobijenim slikama razlike T1 snimaka prisustvo hiperintenziteta signala u tkivu mozga je ukazivalo na propuštanje kontrastnog agensa kroz oštećenu krvno-moždanu barijeru (Slika 33). Povećana propustljivost krvno-moždane barijere je uočena već kod preALS životinja, i to najviše u regionu srednjeg mozga i međumozga, a u manjoj meri i hipokampusa (Slika 33, prva četiri reda). U istim regionima uočeno je dodatno povećanje propustljivosti kod simptomatskih - ALS životinja (Slika 33), kod

kojih je takođe pokazano širenje oštećenja krvno-moždane barijere u anteriornom pravcu ka regionu bazalnih ganglija (Slika 33, poslednja dva reda)



Slika 33. Oštećenje krvno-moždane barijere u mozgu preALS i simptomatskih - ALS pacova. Slike predstavljaju razliku T1-naglašenih snimaka pre i nakon injektovanja kontrastnog agensa, napravljenih snimanjem glave NTg, preALS i ALS pacova pomoću magnetne rezonance. Hiperintenziteti signala (obeleženo plavim strelicama) označavaju mesta ulaska kontrastnog agensa u tkivo mozga što ukazuje na narušenost krvno-moždane barijere. Koordinate date u donjem desnom uglu slika za NTg životinje predstavljaju udaljenost snimljenih regiona mozga od Bregme po antero-posteriornoj osi.

Diskusija

Ćelijske i unutarćelijske promene u mozgu hSOD1 G93A pacova

U ovoj studiji su praćene proliferacija i promene u morfologiji dva tipa glijalnih ćelija, astrocita i mikroglije, u moždanom stablu i hipokampusu presimptomatskih i simptomatskih hSOD1 G93A pacova, kao i promene u količini i unutarćelijskoj distribuciji SOD1 proteina u ovim ćelijama, pomoću imunohistohemijskog bojenja i analize konfokalnih snimaka. Pored toga, urađena je analiza koncentracije različitih fiziološki relevantnih hemijskih elemenata u tkivu moždanog stabla i hipokampusa hSOD1 G93A pacova u simptomatskom stadijumu bolesti pomoću fluorecentnog Rentgenskog zračenja. Rezultati su pokazali različite profile aktivacije glijalnih ćelija i unutarćelijske distribucije i količine SOD1 proteina za koje je pokazano da su specifični za ispitivani moždani region i stadijum bolesti, i otkrili značajne promene u distribuciji i koncentraciji različitih hemijskih elemenata u moždanom tkivu transgenih hSOD1 G93A pacova kao modela ALS.

Proliferacija glijalnih ćelija i akumulacija SOD1 proteina u moždanom tkivu hSOD1 G93A pacova

Imunohistološki rezultati ove studije su pokazali proliferaciju astrocita i mikroglije u gigantocelularnom retikularnom, trigeminalnom i facijalnom jedru moždanog stabla simptomatskih hSOD1 G93A pacova, pri čemu je najizrazitija glijoza uz neuronalnu degeneraciju i progresivnu akumulaciju SOD1 proteina pokazana u facijalnom jedru ovih životinja. Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodnim histološkim studijama na mišjim modelima bolesti sa mutacijama SOD1 proteina (Kadoyama et al., 2007; Ferrucci et al., 2010; An et al., 2014; Evans et al., 2014), koje su pokazale različite stepene oštećenja među ovim jedrima uz najveću pogođenost facijalnog jedra (Nimchinsky et al., 2000). Pored toga, gubitak neurona u facijalnom, trigeminalnom i hipoglosalnom jedru, kao i bulbarna disfunkcija, su pokazani na istom pacovskom hSOD1 G93A modelu bolesti koji je korišćen i u ovoj studiji (Kashlan et al., 2015). Sa

druge strane, sve veći broj podataka pokazuje da patologija u ALS nije ograničena samo na motorne delove CNS, već da bolest pogađa i ne-motorne regione dovodeći do poremećaja u ponašanju i kogniciji (Schreiber et al., 2005; Jelsone-Swain et al., 2012; Phukan et al., 2012; Abdulla et al., 2014). Ova studija dodatno pojačava dokaze o patofiziologiji hipokampusa u ALS pokazivanjem prisustva proliferacije glijalnih ćelija u dentatnom girusu već u presimptomatskoj fazi bolesti. Ovaj rezultat ukazuje da aktivacija glije u ovom regionu nije posledica neuroinflamatornih procesa u motornim regionima mozga već odvojen patološki fenomen, što je u saglasnosti sa prethodnim studijama (Takeda et al., 2007 i 2009) koje su pokazale progresivnu degeneraciju entorinalnog korteksa, perforatnog puta i molekularnog sloja dentatnog girusa kod ALS pacijenata koja nije bila u korelaciji sa jačinom motornih simptoma bolesti. Takođe, pojačana akumulacija SOD1 proteina je pokazana u dentatnom girusu preALS i simptomatskih - ALS životinja u ovoj studiji, koja može da bude uzrok uočene proliferacije glijalnih ćelija.

Promene u morfologiji glijalnih ćelija i unutarćelijskoj distribuciju SOD1 proteina u hSOD1 G93A pacovima

Značaj glijalnih ćelija u ALS patofiziologiji je pokazan u miševima sa himeričnom ekspresijom SOD1 proteina, kod kojih je stepen gubitka motornih neurona zavisio od prisustva mutirane SOD1 u okolnim glijalnim ćelijama (Clement et al., 2003). Takođe, pokazano je da ekspresija mutirane SOD1 isključivo u motornim neuronima ili nije dovoljna da dovede do potpunog fenotipa bolesti (Pramatarova et al., 2001), ili dovodi do značajnog odlaganja u vremenu početka i progresiji bolesti u poređenju sa miševima koji ekspimiraju mutirani protein podjednako u svim ćelijama (Jaarsma et al., 2008). U ovoj studiji, analiza morfoloških parametara je pokazala reaktivni profil astrocita već u presimptomatskoj fazi bolesti u oba ispitivana moždana regiona, sa daljom hipertrofijom ćelijskog tela u simptomatskoj fazi. Sa druge strane, mikroglialne ćelije su pokazale samo male promene u morfologiji u moždanom stablu preALS životinja, dok su aktivirani profil pokazivale tek u simptomatskoj fazi. Slične promene u morfologiji mikroglialnih ćelija su opisane u studiji Ohgomori et al., 2016, u kojoj su pokazani različiti morfološki profili ovih ćelija u kičmenoj moždini u ranom i

kasnom stadijumu bolesti kod hSOD1 G93A miševa, pri čemu su samo mikroglialne ćelije iz kasne simptomatske faze pokazivale istu aktiviranu morfologiju kao mikroglia iz miševa tretirani lipopolisaharidom. Stoga, rezultati ove studije ukazuju na postojanje specifičnog vremenskog sleda odgovora glijalnih ćelija u kojem prvo dolazi do aktivacije astrocita, i to pre ispoljavanje prvih simptoma bolesti, koja je potom praćena aktivacijom mikroglije. Predloženi vremenski sled glijalne aktivacije je u saglasnosti sa prethodnim studijama koje su pokazale da specifično ukidanje ekspresije mutirane SOD1 isključivo u mikrogliji ne dovodi do odlaganja u vremenu početka bolesti, već samo usporava njenu progresiju na taj način produžavajući preživljavanje (Boillee et al., 2006; Wang et al., 2009). Sa druge strane, efekat ukidanja ekspresije mutirane SOD1 isključivo u astrocitima zavisi od mutacija, s obzirom na to da ukidanje ekspresije hSOD1 G85R odlaže vreme početka bolesti i produžava preživljavanje, dok ukidanje ekspresije hSOD1 G37R samo produžava preživljavanje tako što odlaže aktivaciju mikroglije (Yamanaka et al., 2008; Wang et al., 2011). Interesantno je da iako je u ovoj studiji pokazano povećano bojenje na marker mikrogljalnih ćelija, nisu pronađene promene u morfološkim parametrima ovih ćelija u dentatnom girusu preALS i simptomatskih - ALS životinja. S obzirom na to da su mikroglialne ćelije kao glavne imunokompetentne ćelije CNS posrednici neuroinflamatornog odgovora (Philips i Rothstein, 2014), nedostatak njihove aktivacije najverovatnije objašnjava odsustvo uočljivih oštećenja neurona u ovom moždanom regionu.

Formiranje unutarćelijskih nakupina SOD1 proteina, koje je jedno od glavnih patohistoloških obeležja kako sporadičnih tako i familijalnih slučajeva ALS (Shaw i Valentine, 2007; Forsberg et al., 2010; Forsberg et al., 2011), dovodi do raznih poremećaja unutarćelijske homeostaze i neuronalnog oštećenja (Kaur et al., 2016). U ovoj studiji je pokazano progresivno nakupljanje SOD1 proteina u facijalnom jedru i dentatnom girusu hSOD1 G93A pacova, ali u različitoj meri i sa različitim profilom akumulacije. Naime, izrazita akumulacija i agregacija SOD1 proteina u neuronima je uočena samo u facijalnom jedru, gde je takođe prisutna i degeneracija ovih ćelija, dok je akumulacija SOD1 proteina u tkivu dentanog girusa bila homogena i nije pokazivala znakove agregacije. Slična varijabilnost u količini i obrascu akumulacije SOD1 proteina u tkivu je uočena i u različitim jedrima moždanog stabla hSOD1 G93A miševa (An et

al., 2014). Takođe, ova studija pokazuje da akumulacija i agregacija SOD1 proteina unutar astrocita započinje već u presimptomatskoj fazi bolesti, da je prisutna u oba ispitivana regiona, kao i da se odigrava istovremeno sa promenama u ćelijskoj morfologiji astrocita. Ovo je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima na dva mišja modela ALS sa različitim mutacijama SOD1 proteina koja su pokazala da se agregacija SOD1 proteina u astrocitima javlja istovremeno sa formiranjem SOD1 pozitivnih inkluzija u neuronima, i to pre degeneracije neurona i pojave neuroloških simptoma bolesti (Bruijn et al., 1997; Stieber et al., 2000).

Akumulacija mutiranog SOD1 proteina kao i izrazite promene subćelijske strukture u astrocitima izolovanim iz hSOD1 G93A pacova, koje mogu da dovedu do značajnih promena u funkciji ovih ćelija, su pokazane u ovoj studiji. Povećano bojenje na SOD1 protein u astrocitima izolovanim iz hSOD1 G93A pacova kao i prisustvo specifičnih nakupina unutarćelijskog materijala nepravilnog oblika koje nisu bile okružene membranom u citoplazmi ovih ćelija ukazuju na formiranje citoplazmatskih agregata ovog proteina. Sa druge strane, povećan promer unutarćelijskih vezikula, kao i prisustvo složenih multivezikularnih formacija koje su između ostalog sadržale i pomenute nakupine ćelijskog materijala, ukazuje na promene u mehanizmima autofagije u ALS astrocitima. Autofagija predstavlja glavni put za uklanjanje proteinskih agregata i oštećenih organela i stoga ima važnu ulogu u održavanju ćelijske homeostaze. Ovaj katabolički proces podrazumeva formiranje organela označenih kao autofagozomi, koje obuhvataju delove citoplazme sa materijalom koji treba da se odstrani, i koje se kasnije spajaju sa lizozomima i formiraju autolizosome u kojima se odigrava degradacija materijala pomoću lizozomskih enzima. U uslovima ćelijskog stresa dolazi do ushodne regulacije mehanizama autofagije, a promene u ovim mehanizmima ili njihov zastoj mogu da dovedu do ćelijske smrti (Lee et al., 2015). Više studija je pokazalo da su defekti na različitim nivoima autofagije povezani sa mutacijama gena koje uzrokuju ALS, uključujući mutacije u SOD1 (sumirano u Lee et al., 2015), dok je primena trehaloze, jedinjenja koje dovodi do ushodne regulacije mehanizama autofagije, dovela do značajnog smanjenja akumulacije SOD1 agregata, smanjenog gubitka motornih neurona, kao i povećanog preživljavanja i usporene progresije bolesti kod dva različita

mišja modela ALS zasnovana na mutacijama u SOD1 (Castillo et al., 2013; Zhang et al., 2014; Lee et al., 2015).

Unutarćelijska agregacija SOD1 proteina može biti povezana sa patološkim fenotipom astrocita s obzirom na to da je pokazano da astrociti koji ekspimiraju mutirani SOD1 protein otpuštaju toksične faktore koji izazivaju povećano odumiranje motornih neurona (Nagai et al., 2007; Diaz-Amarilla et al., 2011; Haidet-Phillips et al., 2011; Fritz et al., 2013; Meyer et al., 2014). S tim u vezi, rezultati ove studije pokazuju da astrociti izolovani iz hSOD1 G93A pacova pod prooksidativnim uslovima imaju povećanu proizvodnju superoksidnog radikala koja može da bude jedan od glavnih mehanizama toksičnosti koji dovodi do oštećenja motornih neurona. Pored toga, ove ćelije pokazuju pojačan odgovor i u slučaju stimulacije koja kod astrocita izolovanih iz NTg životinja ne dovodi do izrazitog povećanja proizvodnje superoksidnog radikala, što implicira povećanu osetljivost ALS astrocita na prooksidativne stimulse. U ovoj studiji su uočene i interakcije između astrocita i neurona moždanog stabla, uz formiranje specifičnih korpastih struktura astrocitnih nastavaka, što ukazuje na aktivnu ulogu ovog tipa glijalnih ćelija u odumiranju neurona. U ovom pogledu, interesantno je da je povećana ekspresija velikog broja gena odgovornih za međućelijsku komunikaciju pokazana u astrocitima i neuronima izolovanim iz kičmene moždine hSOD1 G93A miševa, kao i to da je pojačana međućelijska komunikaciju istaknuta kao značajan mehanizam toksičnosti astrocita prema motornim neuronima (Phatnani et al., 2013; Almad et al., 2016). Međutim, pored direktne toksičnosti pokazano je i da astrociti koji ekspimiraju mutirani SOD1 protein poseduju smanjenu sposobnost da regulišu vanćelijsku sredinu i održavaju homeostazu u nervnom tkivu. Time se gubi njihova potporna funkcija odgovorna za preživljavanje motornih neurona za koju se predpostavlja da je značajnija za razvoj i progresiju bolesti u odnosu na mehanizme direktne toksičnosti (Baker et al., 2015; Das i Svendsen, 2015).

Sa druge strane, promene unutarćelijske količine i distribucije SOD1 proteina u mikroglialnim ćelijama pokazuju značajne razlike između dva ispitivana moždana regiona, koje su u korelaciji sa morfo-funkcionalnim profilom ovih ćelija. Naime, promene unutarćelijske distribucije SOD1 proteina u mikrogliji moždanog stabla su

primećene samo u simptomatskoj fazi u kojoj ove ćelije zadobijaju aktiviranu morfologiju, dok se mikroglia iz preALS i NTg životinja ne razlikuje ni po morfologiji ni po unutarćelijskoj distribuciji SOD1 proteina. Pored toga, periferna lokalizacija SOD1 proteina isključivo u nastavcima mikroglialnih ćelija simptomatskih - ALS životinja, kao i bliski kontakti ovih ćelija sa neuronima moždanog stabla ukazuju na direktnu ulogu mikroglie u procesu odumiranja neurona. Slične patološke interakcije između motornih neurona i mikroglie su opisane u kičmenoj moždini presimptomatskih hSOD1 H46R pacova (Sanagi et al., 2010). Lokalizacija SOD1 proteina u distalnim nastavcima mikroglialnih ćelija uočena u ovoj studiji može da ukaže na prisustvo procesa egzocitoze, što je podržano prethodnim ispitivanjima koja su pokazala aktivnu sekreciju SOD1 agregata preko egzozoma i signalnog puta posredovanog hromograninom (Urushitani et al., 2006; Gomes et al., 2007; Basso et al., 2013; Silverman et al., 2016) čime dolazi do međućelijskog prenosa i progresivnog razvoja bolesti. Takođe, pokazano je da egzogena primena mutiranog SOD1 proteina može da dovede do oštećenja motornih neurona od strane mikroglialnih ćelija (Zhao et al., 2010).

Ekspresija mutirane SOD1 u mikrogliji takođe dovodi do povećane proizvodnje proinflamatornih posrednika i povećane toksičnosti mikroglialnih ćelija prema motornim neuronima (Weydt et al., 2004; Xiao et al., 2007; Harraz et al., 2008; Meissner et al., 2010). Veza između unutarćelijske distribucije SOD1 proteina i morfo-funkcionalnog profila mikroglie je podržana rezultatima ove studije koji pokazuju sličnu morfologiju ovih glialnih ćelija u dentatnom girusu u sve tri ispitivane grupe životinja, kao i vrlo male razlike u unutarćelijskoj distribuciji SOD1 proteina među njima. Povećanje koeficijenta kolokalizacije i intenziteta unutarćelijskog SOD1 signala koji su uočeni za mikrogliju u dentatnom girusu su najverovatnije pre povezani sa prirodom životinjskog modela bolesti (ekspresija velikog broja kopija mutirane SOD1) nego sa promenama u funkcionalnom profilu ovih ćelija. Različiti morfološki profili mikroglie zajedno sa pokazanim razlikama u količini unutarćelijskog SOD1 proteina, ali i razlikama u količini akumulacije SOD1 proteina u tkivu, između dva analizirana moždana regiona ukazuju da je neophodan kritičan nivo akumulacije SOD1 proteina za aktivaciju mikroglialnih ćelija i posledično oštećenja neurona.

Promene u koncentraciji različitih hemijskih elemenata u tkivu moždanog stabla i hipokampusu simptomatskih hSOD1 G93A pacova

U ovoj studiji pomoću fluorescentnog Rentgenskog zračenja je pokazan povišen nivo kalcijuma u moždanom stablu simptomatskih - ALS pacova, što je ukazalo na poremećaj u tkivnoj homeostazi ovog elementa i podržalo njegovu ulogu u patologiji bolesti. Naime, selektivna ranjivost motornih neurona na povećanje unutarćelijske koncentracija kalcijuma kao posledice ekscitotoksičnosti izazvane prekomernom stimulacijom glutamatom je jedna od glavnih karakteristika ALS (Alexianu et al., 1994; von Lewinski i Keller, 2005; Van Den Bosch et al., 2006; Grosskreutz et al., 2010). Takođe, sposobnost regulacije unutarćelijskog nivoa kalcijuma od strane mitohondrija motornih neurona je smanjena usled akumulacije mutiranog SOD1 proteina u međumembranskom prostoru ovih organela (Jaarsma et al., 2001; Higgins et al., 2002; Pasinelli et al., 2004; Damiano et al., 2006). Sa druge strane, pokazano je da povećanje koncentracije kalcijuma pospešuje agregaciju SOD1 proteina (Tateno et al., 2004; Tradewell et al., 2011; Leal et al., 2013), kao i da poremećena unutarćelijska kalcijumska signalizacija doprinosi toksičnosti astrocita koji ekspimiraju mutirani hSOD1 G93A protein (Kawamata et al., 2014).

Regulacija unutarćelijske homeostaze hlora kao i povećan ulazak ovog jona kroz GABA receptore tokom ekscitatorne sinaptičke transmisije su od velike važnosti pošto mogu da predstavljaju kompenzatorni mehanizam za ublažavanje prekomerne aktivacije pod uticajem ekscitatornih neurotransmitera, ali mogu da budu i štetni za motorne neurone u slučaju dugotrajne ekscitatorne stimulacije (Zanette et al., 2002; Van Damme et al., 2003; Schutz, 2005). Stoga, povećanje koncentracije hlora u facijalnom jedru simptomatskih - ALS pacova koje je uočeno u ovoj studiji može da predstavlja kompenzatorni mehanizam kojim se neutralizuje povećana glutamatergička stimulacija i sprečava pojava ekscitotoksičnosti, ali koji može umesto toga da pogorša ekscitotoksično oštećenje motornih neurona usled poremećene unutarćelijske jonske homeostaze, kao i poremećene ravnoteže između ekscitacije i inhibicije. Doprinos poremećene inhibitorne neurotransmisije smrti motornih neurona usled ekcitotoksičnosti u ALS je podržana studijom koja je pokazala povećanje struje hlora

kroz GABA_A receptor i povećanu ekspresiju $\alpha 1$ podjedinice ovog receptora u motornim neuronima izolovanim iz hSOD1 G93A miševa (Carunchio et al., 2008). Interesantno je i to da riluzol, jedini do sada zvanično odobreni lek za terapiju ALS pacijenata čija se terapijska svojstva pripisuju antiglutamatergičkoj aktivnosti, takođe deluje i na GABA_A receptor dovodeći do njegove brze desenzitizacije i smanjenja ulaska hlora u ćeliju (Mohammadi et al., 2001).

Pored promene hlora ova studija je pokazala praktično isti nivo promene i u koncentraciji kalijuma u facijalnom jedru simptomatskih - ALS pacova, što je ukazalo na poremećaj u regulaciji tkivne homeostaze i ovog elementa. Ova pretpostavka je podržana prethodnim istraživanjem homeostaze vode i jona u ALS koja je pokazala smanjenu ekspresiju Kir 4.1 kalijumskih kanala i povećanu ekspresiju AQP4 kanala za molekule vode u facijalnom i trigeminalnom jedru, kao i motornoj kori velikog mozga hSOD1 G93A pacova, dok su iste promene pokazane i u astrocitima izolovanim iz ovih životinja (Bataveljic et al., 2012). Takođe, smanjena ekspresija KCC2 kontransportera za kalijum i hlor, važnog za regulaciju fizioloških unutarćelijskih koncentracija ova dva elementa, je pokazana u motornim neuronima kičmene moždine i hipoglosalnog jedra moždanog stabla hSOD1 G93A miševa već u presimptomatskoj fazi bolesti (Fuchs et al., 2010). Svi navedeni rezultati se mogu tumačiti kao promena u sposobnosti osmoregulacije u ovim ćelijama koje mogu da dovedu do promena u morfologiji koje su takođe uočene u ovoj studiji.

Kao što je pokazano u prethodnim istraživanjima (Kim et al., 2009; Tokuda et al., 2013), povećane koncentracije bakra i cinka u facijalnom jedru simptomatskih - ALS pacova uočene u ovoj studiji su posledica povećane ekspresije mutiranog SOD1 proteina. Međutim, poremećena regulacija homeostaze ova dva metala je naizgled opšta karakteristika bolesti kod ljudi, iako tačan mehanizam poremećaja homeostaze nije u potpunosti jasan pošto su različita istraživanja pokazala ili smanjenje ili povećanje koncentracije ova dva elementa u cerebrospinalnoj tečnosti, serumu ili *post mortem* tkivu ALS pacijenata (Kanas i Kapaki, 1997; Ostachowicz et al., 2006; Tomik et al., 2006; Hozumi et al., 2011; Roos et al., 2013). Takođe, pokazana je ključna uloga jona bakra u stimulaciji agregacije SOD1 proteina u uslovima povećane proizvodnje

slobodnih radikala (Mulligan et al., 2012; Li et al., 2013), što je dodatno podržano istraživanjem koje je pokazalo redistribuciju bakra u kičmenoj moždini hSOD1 G93A miševa ka regionima u kojima je bila prisutna izrazita akumulacija SOD1 proteina (Lelie et al., 2011). Sa druge strane, povećano nakupljanje cinka koje koreliše sa degeneracijom motornih neurona je pokazano u neuronima i astrocitima koji su sadržali agregate SOD1 proteina u kičmenoj moždini hSOD1 G93A miševa (Kim et al., 2009). Multifokalna distribucija bakra i cinka koja ukazuje na specifičnu akumulaciju ovih metala u određenim tipovima ćelija, kao i izrazita agregacija SOD1 proteina u neuronima i astrocitima facijalnog jedra moždanog stabla ALS pacova su takođe pokazani u ovoj studiji. Interesantno je da je smanjenje koncentracije cinka uočeno u dentatnom girusu ovih životinja, što ukazuje na specifičnu redistribuciju ovog metala među različitim regionima mozga pogođenog bolešću. Slična redistribucija cinka je pokazana u tkivu kičmene moždine hSOD1 G93A miševa (Lelie et al., 2011).

Iznenadjući nalaz ove studije je izrazito povećanje u koncentraciji nikla u facijalnom jedru i dentatnom girusu simptomatskih - ALS pacova. Nedostatak nikla u ishrani kao i preterano izlaganje ovom metalu mogu da utiču na usvajanje drugih bitnih metala kao što su gvožđe, bakar, cink i kalcijum (Spears et al., 1986; Funakoshi et al., 1996; Salnikow et al., 1999). Međutim, izuzev jedne studije koja je ispitala koncentraciju nikla u cerebrospinalnoj tečnosti i krvnoj plazmi u maloj populaciji ALS pacijenata u Norveškoj (Roos et al., 2013), nisu urađene druge studije koje istražuju homeostazu nikla u ovoj bolesti. Uočeno povećanje koncentracije nikla u tkivu može biti posledica njegovog vezivanja za mutirani SOD1 protein. Naime, pokazano je da nikl može da zameni i cink i bakar u mestima za vezivanje metala SOD1 proteina i da dovede do formiranja Ni_2Cu_2SOD1 ili Ni_2Ni_2SOD1 (Ming i Valentine, 2014). Uočeno je i da je vezivanje cinka za SOD1 G93A slabije u odnosu na normalan SOD1 protein (Lyons et al., 1996), kao i da mutacije u ovom proteinu koje izazvaju ALS povećavaju formiranje prelaznih vrsti SOD1 dimera koje ne vezuju bakar (Ip et al., 2011). Takođe, pokazano je da nerastvorljive frakcije SOD1 proteina izolovane iz kičmene moždine miševa sa različitim mutacijama u SOD1 proteinu, uključujući SOD1 G93A, nemaju vezane cink i bakar (Lelie et al., 2011), pa s toga mogu da predstavljaju populaciju SOD1 proteina koja vezuje nikl dovodeći na taj način do njegovog nakupljanja u tkivu.

Interesantno je da u ovoj studiji nisu uočene statistički značajne promene u tkivnoj koncentraciji gvožđa. Kako je uloga ovog metala u patofiziologiji bolesti jasno pokazana brojnim istraživanjima (Vonk i Klomp, 2008; Lovejoy i Guillemin, 2014) moguće je da za patologiju ALS nije bitna njegova količina u tkivu, već oksidativni status i raspoloživost slobodnog redoks-aktivnog gvožđa, što je i podržano prethodnim studijama (Ignjatović et al., 2012; Popović-Bijelić et al., 2016). Na kraju, uočeno smanjenje u nivou fosfora u tkivu facijalnog jedra simptomatskih - ALS pacova može da predstavlja odraz gubitka fosfolipida ćelijske membrane usled degeneracije neurona koja je pokazana imunohistohemijskim bojenjima.

Promena redoks statusa i povećanje propustljivosti krvno-moždane barijere u mozgu hSOD1 G93A pacova

U ovoj studiji redoks status i propustljivost krvno-moždane barijere u mozgu presimptomatskih i simptomatskih transgenih hSOD1 G93A pacova su ispitani pomoću *in vivo* EPR spektroskopije korišćenjem tri spinske probe, Tempol, 3CP i 3CxP, koje poseduju različite sposobnosti prolaska kroz krvno-moždanu barijeru i ćelijske membrane. Takođe, urađeni su i eksperimenti *in vitro* redukcije nitroksida askorbatom i *ex vivo* eksperimenti redukcije nitroksida u svežoj krvi pacova, kako bi se preciznije odredio doprinos redukcije bioreduktanatima iz krvi u ukupnoj redukciji nitroksida *in vivo*, što bi omogućilo pouzdanije farmakokinetičko modelovanje. Pored toga, redoks status dva funkcionalno različita regiona mozga za koje je prethodnim eksperimentima pokazano da su pogođeni u ALS, moždanog stabla i hipokampusu, je ispitan biohemijskim analizama. Takođe, stanje krvno-moždane barijere kod ovih životinja je ispitano oslikavanjem pomoću magnetne rezonancije. Ispitivanje farmakokinetike nitroksida u glavi pomoću EPR spektroskopije je pokazalo značajne razlike između kontrolnih i transgenih hSOD1 G93A pacova, i podaci dobijeni iz *in vivo* kinetika redukcije nitroksida su ukazali na oštećenu krvno moždanu barijeru, što je potvrđeno oslikavanjem magnetnom rezonancijom, kao i na izmenjen redoks status moždanog tkiva već u presimptomatskoj fazi bolesti, što je potvrđeno biohemijskim analizama.

Međutim, kako bi se opravdao izbor nitroksida korišćenih u eksperimentima, i u potpunosti objasnilo farmakokinetičko modelovanje i analiza redukcije *in vivo*, moraju se u obzir uzeti i rezultati *in vitro* i *ex vivo* eksperimenata.

In vitro i ex vivo redukcija nitroksida

Nakon injekcije u životinju, koncentracija nitroksida u krvotoku zavisi od njegove redukcije bioreduktantima prisutnih u krvnoj plazmi kao što je askorbat, kao i od redukcije unutarćelijskim reduktantima u ćelijama krvnog tkiva koja zavisi od sposobnosti prolaska nitroksida kroz ćelijsku membranu (Zhelev et al., 2009). Rezultati *in vitro* eksperimenata ove studije su potvrdili dobro ustanovljenu činjenicu da konstanta brzine redukcije nitroksida zavisi od njihove hemijske strukture, tako da jedinjenja koja kao osnovu imaju šestočlani piperidinski prsten, kao što je Tempol, imaju veću konstantu brzine redukcije u poređenju sa analognim jedinjenjima koja kao osnovu imaju petočlani pirolidinski prsten, kao što su 3CP i 3CxP (Couet et al., 1985; Keana et al., 1987; Vianello et al., 1995). Takođe, pošto je askorbat negativno naelektrisan na pH = 7,4, u obzir se mora uzeti i naelektrisanje nitroksida koje zavisi od bočne grupe vezane za prsten. U tom smislu redukcija u prisustvu askorbata je brža za pozitivno naelektrisane nitrokside kao što su Tempamin i 3-amino-metil-proksil u poređenju sa negativno naelektrisanim jedinjenjima kao što je 3CxP, zbog lakše razmene elektrona između askorbata i pozitivno naelektrisanih nitroksida (Couet et al., 1985; Vianello et al., 1995). Iako konstante brzine redukcije nitroksida *in vitro* zavise od mnogih promenljivih faktora kao što su pH, jonska snaga i temperatura, što otežava direktno poređenje vrednosti konstanti brzine redukcije dobijenih u ovoj studiji sa vrednostima opisanim u literaturi, odnos konstanti brzine redukcije korišćenih nitroksida je u saglasnosti sa prethodnim studijama na ovu temu (Keana et al., 1987; Vianello et al., 1995; Hyodo et al., 2006). Važnost ovih podataka za analizu *in vivo* farmakokinetike se ogleda u činjenici da doprinos askorbata ukupnoj redukciji pojedinih nitroksida može da bude između 50% i 70% u homogenatima moždanog tkiva i 50 % do 90% u uzorcima krvi (Vianello et al., 1995).

Kako bi se ispitaio doprinos redukcije u krvi ukupnoj kinetici redukcije nitroksida, urađeni su eksperimenti *ex vivo* redukcije u sveže izolovanoj krvi pacova. Vrednosti za vreme poluredukcije Tempola u krvi objavljene u literaturi se kreću u širokom opsegu od 8 (Vianello et al., 1995) do 50 min (Nishino et al., 1999), dok je vrednost dobijena u ovoj studiji na donjem kraju ovog opsega. Prijavljene vrednosti za vreme poluredukcije 3CP i 3CxP su oko 180 (Zhelev et al., 2009) i 288 min (Vianello et al., 1995), dok su vrednosti dobijene u ovoj studiji malo veće za oba korišćena nitroksida, najverovatnije zbog korišćenja crevaca propusnih za gasove u eksperimentima što je održavalo oksigenaciju krvi u uzorcima i usporilo redukciju nitroksida. Merenja *in vivo* redukcije nitroksida u krvotoku glodara je pokazalo da je redukcija EPR signala nitroksida u krvotoku za jedan do dva stepena veličine brža (sa vremenom poluredukcije od 1 – 2 min) u poređenju sa redukcijom u krvi *ex vivo* (Matsumoto et al., 2004; Okajo et al., 2006; Zhelev et al., 2009). Slični rezultati su dobijeni i direktnim merenjem povećanja relaksacije signala u prisustvu nitroksida u arterijskoj krvi korišćenjem magnetne rezonancije (Hyodo et al., 2006). Razlike između ove dve vrste merenja potiču iz činjenice da *ex vivo* merenja daju informacije o redukcionoj moći same krvi, dok u *in vivo* eksperimentima izmerena kinetika redukcije signala nitroksida daje informacije o procesima u celom organizmu kao što su redukcija u organima, izbacivanje preko bubrega, itd. S toga, rezultati dobijeni u *ex vivo* eksperimentima moraju se uzeti u obzir kada se odlučuje o tome da li će se redukcija nitroksida u samoj krvi uključiti u model koji opisuje ukupnu redukciju nitroksida *in vivo*. U ovoj studiji redukcija nitroksida u krvi *ex vivo* je bila za red veličine manja od redukcije nitroksida u glavi *in vivo*, i stoga redukcija nitroksida u samoj krvi nije morala biti uključena u model koji opisuje ukupnu redukciju signala *in vivo* što je pojednostavilo farmakokinetičko modelovanje.

In vivo redukcija nitroksida

U biološkim sistemima, redukcija nitroksida se odvija skoro isključivo u unutarćelijskim odeljcima i stoga je dodatno uslovljena sposobnošću nitroksida da prođe ćelijsku membranu, što zavisi od njegovog naelektrisanja i rastvorljivosti u mastima (Swartz et al., 1986; Keana et al., 1987; Iannone et al., 1989; Vianello et al., 1995;

Yamato et al., 2003). Usled prisustva hidroksilne grupe, Tempol je amfifilno jedinjenje sa velikom sposobnošću prolaska kroz ćelijsku membranu (Alecci et al., 1994; Matsumoto et al., 2011). Hidrofilna jedinjenja kao što je 3CP imaju ograničenu sposobnost prolaska (Yamada et al., 2004; Matsumoto et al., 2006), dok 3CxP kao hidrofilno i negativno naelektrisano jedinjenje usled prisustva karboksilne grupe ne može da prođe kroz ćelijsku membranu osim aktivnim anjonskim transportom (Ichikawa et al., 2006). Kao što je očekivano, rezultati ove studije su pokazali najbržu konstantu brzine *in vivo* redukcije Tempol-a u glavi NTg pacova. Konstanta brzine redukcije 3CP je bila značajno sporija, dok je 3CxP pokazao najsporiju kinetiku redukcije. Manje konstante brzine redukcije i uočene razlike u redukcionim krivama za 3CP i 3CxP se mogu objasniti različitim karakteristikama distribucije ove dve spinske probe (Hyodo et al., 2006). Konstanta brzine redukcije nitroksida *in vivo* zavisi od njegovog prelaska iz krvotoka u tkivo, kao i od njegove redukcije u tkivu koja odražava redoks status odgovarajućeg organa (Bacic et al., 1989; Gallez et al., 1996; Yamada et al., 2002). Sa druge strane, koncentracija nitroksida u krvotoku je takođe pod uticajem urinarnе ekskrecije kroz bubrege i fekalne ekskrecije kroz jetru i žuč (Nishino et al., 1999; Matsumoto et al., 2004).

Distribucija iz krvotoka u tkivo i fekalna ekskrecija nitroksida su procesi koji zavise od sposobnosti prolaska kroz ćelijske membrane. Stoga, nitroksidi koji poseduju ovu sposobnost mogu da uđu i budu redukovani u više različitih tkiva i organa, kao i eliminisani iz krvotoka i urinarnom i fekalnom ekskrecijom. Ovo rezultuje u kompleksnim profilima redukcionih krivih kao što je i potvrđeno redukcionom kinetikom 3CP dobijenom u ovoj studiji. Uočena stagnacija redukcije signala u kasnijoj fazi krive redukcije 3CP može biti objašnjena ravnotežom između procesa redukcije i reoksidacije spinske probe, kao i zasićenjem procesa ekskrecije, što se i očekuje kada je primenjena koncentracija nitroksida relativno visoka (Matsumoto et al., 2004), kao što je slučaj u ovoj studiji. Sa druge strane, konstanta brzine redukcije nitroksida koji ne mogu da prođu ćelijsku membranu je uglavnom uslovljena stopom urinarnе ekskrecije (Grodd et al., 1987; Ferrari et al., 1990) što objašnjava dobijenu monoeksponencijalnu kinetiku redukcije 3CxP. Međutim, treba istaći da je *in vivo* redukcija 3CxP bila značajno brža u poređenju sa redukcijom ovog nitroksida u sveže izolovanoj krvi, što se

teško objašnjava isključivo urinarnom ekskrecijom ove probe *in vivo* i implicira postojanje unutarćelijske redukcije. I zaista, iako 3CxP generalno ne može da prođe kroz ćelijske membrane, pokazano je da postoji aktivan unos ovog jedinjenja u ćelije jetre preko organskog anjonskog transportera (Ichikawa et al., 2006), što dovodi do unutarćelijske redukcije 3CxP u jetri. Razlike u distribuciji i redukciji između 3CP i 3CxP *in vivo* su vrlo jasno pokazane u studiji Hyodo et al., 2006 korišćenjem fuzionisane tehnike EPR/MRI. Naime, pokazana je brza i široka distribucija 3CP u celom gornjem i središnjem abdomenu eksperimentalnih miševa, dok je 3CxP pokazao sporiju *in vivo* redukciju kao i manju, selektivnu distribuciju u srcu, jetri i naročito u bubrezima gde je njegov signal najduže bio prisutan. Ovakva selektivna distribucija 3CxP je pokazana i u studiji Sano et al., 1997 u kojoj je najveća koncentracija redukovanog i neredukovanog 3CxP nađena u bubrezima, krvi, jetri i srcu. U ovoj studiji Tempol je takođe pokazao naizgled monoeksponencijalnu kinetiku *in vivo* redukcije u glavi NTg pacova. Međutim, u ovom slučaju monoeksponencijalna kinetika je posledica visoke osetljivosti ovog nitrokida za redukciju bioreduktantima, kao i njegove velike sposobnosti prolaska kroz ćelijske membrane koja omogućava efikasnu unutarćelijsku razgradnju, što sve ne pruža dovoljnu vremensku rezoluciju za preciznu analizu redukcionne kinetike. Pretpostavka da Tempol i njegovi derivati ulaze u moždano i druga tkiva gde se brzo redukuju je u saglasnosti sa prethodnim studijama gde je isti zaključak donešen u svim ispitivanim slučajevima (Ishida et al., 1992; Miura et al., 1992; Vianello et al., 1995; Zhelev et al., 2009; Zhelev et al., 2009; Davis et al., 2011; Bakalova et al., 2013). Tempol je isključen iz daljih eksperimenata, obzirom na to da je bilo malo verovatno da nitroksid sa velikom sposobnošću prolaska kroz ćelijsku membranu može da otkrije potencijalno finije razlike u propustljivosti krvno-moždane barijere između NTg i hSOD1 G93A pacova.

Kako bi se odredili specifični faktori koji doprinose redukciji nitroksida u određenom organu, redukciona kinetika spinske probe mora biti ispitana u odsustvu njenog ispiranja iz organa putem krvotoka (Hyodo et al., 2008). Rezultati ove studije su pokazali povećano vreme poluredukcije 3CP i 3CxP u glavi NTg životinja kod kojih je protok krvi zaustavljen srčanim zastojem izazvanim injektovanjem rastvora KCl. Na taj način je potvrđen doprinos uklanjanja cirkulacijom krvi ukupnoj kinetici redukcije za

oba nitroksida, iako u većem stepenu za 3CxP u odnosu na 3CP. Ova razlika se takođe može objasniti različitim karakteristikama distribucije ove dve probe. Kao što je ranije napomenuto, eliminacija 3CxP iz krvotoka je pod najvećim uticajem urinarne ekskrecije koja je ukinuta zaustavljanjem protoka krvi, što dovodi do značajnog povećanja vremena poluredukcije 3CxP. Međutim, redukcija oba nitroksida je i dalje bila prisutna u glavi NTg pacova, iako je protok krvi zaustavljen što ukazuje da je u takvoj situaciji redukcija proba uglavnom uslovljena reakcijom sa vanćelijskim i još važnije unutarćelijskim bioreduktantima ili slobodno radikalnim vrstama u ispitivanom organu. U slučaju moždanog tkiva, ovaj proces je dodatno ograničen zbog prisustva krvno-moždane barijere, s obzirom na to da je pokazano da ni 3CP ni 3CxP ne mogu kroz nju da prođu (Hiramatsu et al., 1995; Yokoyama et al., 1998; He et al., 2002; Anzai et al., 2003; Lee et al., 2004; Hyodo et al., 2008; Caia et al., 2012; Zhelev et al., 2012; Matsumoto et al., 2016). Međutim, 3CP kao jedinjenje koje poseduje delimičnu sposobnost prolaska kroz ćelijsku membranu može da uđe u ćelije drugih tkiva u glavi gde će biti redukovan, kao što su mandibularni mišići, mišići lica i jezika, pljuvačne žlezde, itd. Ovo je potvrđeno rezultatima ove studije koji pokazuju isti intenzitet signala 3CP posle 60 minuta i kod životinja sa izazvanim srčanim zastojem i kod onih sa normalnim krvotokom. Sa druge strane, distribucija 3CxP, kao jedinjenja koje ne poseduje sposobnost prolaska kroz ćelijske membrane, u tkivo je moguća samo sporom difuzijom kroz intersticijalni prostor između ćelija. Takođe, pošto ne može da uđe u ćelije, njegova redukcija je ograničena na vanćelijski prostor, što je i potvrđeno rezultatima ove studije koji pokazuju vrlo sporu redukciju 3CxP u glavi životinja sa izazvanim srčanim zastojem.

Rana i kasna faza *in vivo* kinetike redukcije nitroksida su pod uticajem različitih procesa. Rana faza uglavnom odražava distribuciju i redukciju probe unutar ciljnog organa, kao i redistribuciju u druge organe, dok kasna faza uglavnom zavisi od procesa urinarne i fekalne ekskrecije (Kocherginsky i Swartz, 1995; Matsumoto et al., 2004). Kao i kod većine procesa koji su pod uticajem sposobnosti prolaska kroz ćelijske membrane, njihov doprinos različitim fazama može da varira u zavisnosti od korišćene spinske probe. Iz tog razloga određivanje kinetike brzine redukcije iz početnog nagiba redukcionih krive i vreme poluredukcije nisu precizne mere *in vivo* redoks statusa ciljnog

organa. Takođe, ove mere ne mogu da razlikuju doprinos specifičnih faktora ukupnoj kinetici redukcije nitroksida. Ovo je potvrđeno izostankom značajnih razlika u vremenu poluredukcije 3CP u glavi NTg, preALS i simptomatskih - ALS životinja, iako sve tri grupe pokazuju različite profile redukcionih krivih 3CP. Stoga, da bi se tačno odredila uloga različitih procesa u *in vivo* redukciji spinskih proba, krive redukcije EPR signala nitroksida su analizirane pomoću dvo-komornog modela koji definiše tri faktora koji doprinose redukciji EPR signala nitroksida: uklanjanje iz glave putem krvotoka, distribucija u tkivu i redukcija u tkivu.

Kao što je prethodno navedeno, kinetika brzine uklanjanja nitroksida krvotokom ne odražava samo prosto ispiranje probe iz ciljnog organa protokom krvi, već i distribuciju i redukciju probe u drugim organima. Stoga, povećana kinetika brzine uklanjanja krvotokom 3CP koja je pokazana kod simptomatskih - ALS pacova može da ukazuje na izmenjen redoks status drugih organa u ovim životinjama. Ova pretpostavka je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima koja su pokazala povećanu lipidnu peroksidaciju u kičmenoj moždini, jetri i skeletnim mišićima simptomatskih hSOD1 G93A miševa (Hall et al., 1998; Mahoney et al., 2006; Jonsson et al., 2008; Miana-Mena et al., 2011). Iako ni u jednom od tih istraživanja nije nađeno izrazito povećanje parametara oksidativnog stresa u ovim organima u presimptomatskom stadijumu bolesti primećen je trend porasta ovih parametara, što je u saglasnosti sa porastom kinetike brzine uklanjanja 3CP krvotokom kod preALS pacova koji je pokazan u ovoj studiji, iako bez statistički značajne razlike. Analiza kinetike redukcije 3CP pomoću dvo-komornog modela je takođe pokazala povećanu kinetiku brzine distribucije nitroksida u tkivu glave preALS i simptomatskih - ALS u poređenju sa NTg životinjama. Histološki dokazi oštećenja krvno-moždane barijere su pokazani i u presimptomatskom i u simptomatskom stadijumu bolesti kod mišjeg i pacovskog hSOD1 G93A modela (Garbuzova-Davis et al., 2007; Nicaise et al., 2009). Takođe, ispitivanje pomoću magnetne rezonancije integriteta krvno-moždane barijere i infiltracije ćelija imunskog sistema iz krvi pokazalo je oštećenu krvno-moždanu barijeru u moždanom stablu i hipokampusu hSOD1 G93A pacova u simptomatskoj fazi bolesti (Andjus et al., 2009; Bataveljic et al., 2009; Bataveljic et al., 2011). Rezultati ove studije pokazuju da je povećana propustljivost krvno-moždane barijere hSOD1 G93A pacova prisutna već u

presimptomatskom stadijumu bolesti u regionu međumozga, srednjeg mozga i hipokampusa, kao i da se oštećenje ove barijere širi u anteriornom pravcu ka regionu bazalnih ganglija kod simptomatskih životinja. Stoga, uočene promene u kinetici brzine distribucije 3CP u tkivu su najverovatnije odraz povećane propustljivosti oštećene krvno-moždane barijere u preALS i simptomatskim - ALS životinjama.

Promena redoks statusa u mozgu hSOD1 G93A pacova

Rezultati ove studije su takođe pokazali povećanu kinetiku brzine redukcije 3CP u tkivu glave preALS i simptomatskih - ALS životinja, što je ukazalo na izmenjen redoks status ili povećanu proizvodnju slobodno radikalskih vrsta. Kinetika brzine redukcije 3CP u *in vivo* sistemu može da bude pod uticajem velikog broja reaktivnih vrsta. Tako, nitroksidi mogu da budu prevedeni u odgovarajući EPR-nevidljivi oksoamonijumski katjon reakcijom sa različitim oksidansima kao što su superoksidni (Krishna et al., 1992; Goldstein et al., 2003), hidroperoksilni (Goldstein et al., 2003), natrijum dioksidni i karbonatni radikali (Goldstein et al., 2004; Goldstein et al., 2006), kao i redoks aktivne forme gvožđa (Yamaguchi et al., 1984; Krishna et al., 1996), što sve dovodi do ubrzane redukcije EPR signala nitroksida. Sa druge strane, oksoamonijumski katjon može da, u prisustvu dvo-elektronskih donora kao što su NAD(P)H i tioli (Goldstein et al., 2003), reaguje sa superoksidnim radikalom i bude redukovan ili u nitroksidnu formu (Krishna et al., 1992), ili u odgovarajući hidroksilamin, koji takođe ne može da se detektuje EPR spektroskopijom. Hidroksilamin, pak, može da bude reoksidovan reakcijom sa različitim reaktivnim vrstama nazad u nitroksidnu formu, što doprinosi ćelijskom recikliranju nitroksida i dovodi do usporene redukcije njegovog EPR signala (Zhang et al., 1999; Samuni et al., 2002; Goldstein i Samuni, 2007). Stoga, ravnoteža između sposobnosti tkiva za redukciju i lokalne proizvodnje slobodno radikalskih vrsta određuje kinetiku brzine redukcije signala nitroksida. Bitna uloga proizvodnje reaktivnih slobodno radikalskih vrsta za redukciju nitroksida je pokazana u različitim *in vivo* modelima bolesti i patoloških stanja primenom antioksidanata (Yamato et al., 2003), inhibitora sinteze azotnog oksida (Fujii et al., 2013), kao i jedinjenja koja reaguju sa alkilperoksidnim i

hidroksilnim radikalima (Han et al., 2001; Takeshita et al., 2006), što je sve dovodilo do smanjenja konstante brzine redukcije signala nitroksida.

Imajući ovo u vidu, pokazano povećanje kinetike brzine redukcije 3CP kod preALS i simptomatskih - ALS pacova najverovatnije odražava povećanu proizvodnju slobodno radikalskih vrsta u moždanom tkivu ovih životinja. Bitna uloga oksidativnog stresa u patologiji ALS je pokazana i kod ljudi i kod životinjskih modela zasnovanih na mutacijama u SOD1 (Barber i Shaw, 2010). Iako su toksična dejstva mutirane SOD1 u ovoj bolesti još uvek predmet istraživanja, predloženo je nekoliko različitih mehanizama. Jedan od njih podrazumeva smanjenje dismutazne aktivnosti SOD1 enzima koje dovodi do povišenog nivoa superoksidnog radikala koji potom reaguje sa azotnim oksidom pri čemu se stvara vrlo reaktivni peroksininitrit koji vrši nitrilaciju tirozinskih nastavaka u proteinima i uzrokuje njihovo oštećenje (Beckman et al., 1993). Drugi mehanizam pretpostavlja poremećenu aktivnost mutirane SOD1 usled otvorenije konformacije ovog enzima koja dozvoljava da drugi supstrati pored superoksidnog radikala uđu u aktivni centar i reaguju sa jonima bakra u njemu, što dovodi do povećane proizvodnje hidroperoksidnog radikala kroz Fentonovu reakciju (Rosen et al., 1993). Sa druge strane, čak i enzimatski neaktivan SOD1 enzim koji nije vezao bakar može da dovede do povećanog oksidativnog stresa, što se pripisuje ulozi SOD1 proteina u regulaciji proizvodnje superoksidnog radikala od strane NADPH oksidaznog kompleksa u aktiviranim mikroglialnim ćelijama (Harras et al., 2008). Međutim, pored efekta mutirane SOD1, postoji veliki broj dokaza da se povišeni oksidativni stres u ALS može pripisati poremećenoj homeostazi redoks aktivnog gvožđa, što takođe može da dovede do povećane proizvodnje hidroperoksidnog radikala kroz Fentonovu reakciju (Hadzhieva et al., 2014). Iako su prethodna istraživanja pokazala povećano nakupljanje gvožđa u sivoj masi precentralnog girusa ALS pacijenata koje je u korelaciji sa progresijom bolesti (Ignjatović et al., 2013), kao i sa promenama u vezivanju gvožđa u cerebrospinalnoj tečnosti ALS pacijenata koje dovode do povećane redoks aktivnosti gvožđa i proizvodnje hidroksilnog radikala (Ignjatović et al., 2012), u ovoj studiji nisu nađene statistički značajne razlike u koncentraciji ovog metala u tkivima NTg i ALS životinja. Međutim, za patologiju ALS umesto količine od većeg značaja možda može biti oksidativno stanje gvožđa, što je potvrđeno studijom koja je pokazala povišene

nivoje oksidovanih gvožđe-sumpor grupa u kičmenoj moždini, moždanom stablu, hipokampusu i kori velikog mozga hSOD1 G93A pacova, koje mogu da budu izvor slabo vezanog redoks-aktivnog gvožđa koje je uključeno u patogenezu bolesti (Popović-Bijelić et al., 2016)

Prethodna istraživanja (Andjus et al., 2009; Bataveljić et al., 2009; Bataveljić et al., 2011; Popović-Bijelić et al., 2016), kao i histološki rezultati ove studije, su pokazali promene u moždanom stablu i hipokampusu hSOD1 G93A pacova, što je ukazalo na potrebu ispitivanja parametara oksidativnog stresa u ovim moždanim strukturama pomoću biohemijskih testova. Ovi testovi su pokazali povećanu proizvodnju superoksidnog radikala i količinu nitrta kako u preALS tako i u simptomatskim - ALS životinjama. Ovaj rezultat ukazuje na smanjenu eliminaciju superoksidnog radikala koji potom može da reaguje sa azotnim oksidom na taj način dovodeći do stvaranja visoko reaktivnog peroksinitrita i uočene nitrilacije proteina. Ovo je takođe podržano pokazanim progresivnim smanjenjem aktivnosti SOD1 enzima u preALS i simptomatskim - ALS životinjama, što je najverovatnije posledica unutarćelijske agragecije mutirane SOD1 koja je pokazana u ovoj studiji i koja predstavlja glavno histološko obeležje bolesti (Bruijn et al., 1998; Wang et al., 2008). Povećana lipidna peroksidacija je takođe pokazana u oba ispitivana moždana regiona preALS i simptomatskih - ALS životinja, što podržava hipotezu o povećanoj proizvodnji hidroksilnog radikala kroz Fentonovu reakciju. Pored toga, aktivnost SOD2 je bila povišena već kod preALS životinja, ali bez dodatnog porasta u simptomatskoj fazi bolesti. Ovo povećanje aktivnosti SOD2 najverovatnije predstavlja kompenzatorni mehanizam antioksidativne zaštite koji je pokrenut povećanim oksidativnim stresom i smanjenjem aktivnosti SOD1. Ova pretpostavka je u saglasnosti sa prethodnim studijama koje su pokazale povećan nivo ekspresije SOD2 u moždanom stablu ALS pacijenata, i presimptomatskih i simptomatskih hSOD1 G93A miševa (Liu et al., 1998; Chung et al., 2003), kao i povišene nivoe mangana (metala u ovom metaloenzimu) u cerebrospinalnoj tečnosti i krvnoj plazmi ALS pacijenata (Roos et al., 2012; Roos et al., 2013). Iako su parametri oksidativnog stresa detaljno ispitani u kičmenoj moždini ALS pacijenata i mišjih modela bolesti zasnovanih na mutacijama u SOD1 (Barber i Shaw, 2010), samo jedna studija (An et al., 2014) je prethodno pokazala povećan oksidativni

stres u moždanom stablu hSOD1 G93A miševa u završnom stadijumu bolesti. Ova studija potvrđuje oksidativni stres u moždanom stablu i po prvi put pokazuje da se oksidativa oštećenja javljaju i u hipokampusu, kao i da su oba moždana regiona pogođena već u presimptomatskoj fazi bolesti.

Usled ograničene distribucije u tkivu, nitroksidi koji ne poseduju sposobnost prolaska kroz ćelijsku membranu se smatraju neprikladnim za ispitivanje redoks statusa ćelija i tkiva (Hyodo et al., 2006; Hyodo et al., 2008; Zhelev et al., 2009). Ovo je potvrđeno rezultatima ove studije koji su pokazali skoro identične krive redukcije 3CxP u glavi životinja iz sve tri eksperimentalne grupe, bez razlika u vremenima poluredukcije. Takođe, analiza redukcionih kinetika pomoću dvo-komornog modela nije pokazala razlike ni u jednom od kinetičkih parametara, iako je trend porasta primećen u kinetici brzine distribucije nitroksida u tkivu kod preALS i simptomatskih - ALS pacova, što ukazuje na povećanu propustljivost krvno-moždane barijere kod ovih životinja. Stoga, iako 3CxP može da uđe u moždano tkivo usled oštećenja krvno-moždane barijere, njegova nemogućnost da prođe ćelijsku membranu i da pruži informaciju o unutarćelijskom redoks statusu ga čini neprikladnim za ispitivanje promena redoks statusa moždanog tkiva u ALS. Ipak, ovi rezultati pružaju bitnu informaciju da su patofiziološki mehanizmi uključeni u redoks promene u ALS isključivo unutarćelijski.

Zaključci

Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj studiji mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Proliferacija glijalnih ćelija, astrocita i mikroglije, je prisutna i u motornim i u nemotornim centrima mozga presimptomatskih i simptomatskih hSOD1 G93A pacova.
2. U moždanom stablu hSOD1 G93A pacova aktivacija astrocita prethodi aktivaciji mikroglije, i prisutna je već u presimptomatskoj fazi bolesti.
3. Aktivacija astrocita je prisutna i u hipokampusu hSOD1 G93A pacova već u presimptomatskoj fazi, dok patološka aktivacija mikroglije u ovom moždanom regionu nije prisutna.
4. Izrazita neurodegeneracija u moždanom stablu hSOD1 G93A pacova uz prisustvo bliskih kontakata aktivirane mikroglije sa neuronima moždanog stabla, kao i izostanak aktivacije mikroglije u hipokampusu hSOD1 G93A pacova uz izostanak neurodegeneracije u ovom moždanom regionu, ukazuju na bitnu ulogu mikroglije u odumiranje neurona.
5. Promene u unutarćelijskog količini i distribuciji SOD1 proteina u glijalnim ćelijama u moždanom tkivu hSOD1 G93A pacova pokazuju vremensku (presimptomatska vs simptomatska faza), regionalnu i ćelijsku specifičnost, i u korelaciji su sa morfološkim profilom ovih ćelija.
6. Astrociti izolovani iz hSOD1 G93A pacova pokazuju izrazite promene unutarćelijske strukture, kao i povećanu osetljivost na prooksidativne stimulse.
7. Promene u količini različitih fiziološki relevantnih elemenata su prisutne u moždanom stablu i hipokampusu simptomatskih hSOD1 G93A pacova, i mogu se dovesti u vezu sa opisanim patološkim promenama.
8. Oksidativni stres, koji se ogleda u promenjenom redoks statusu moždanog tkiva, je prisutan u mozgu hSOD1 G93A pacova već u presimptomatskoj fazi bolesti, i po prvi put je pokazan *in vivo* u ovoj studiji.
9. *In vivo* EPR spektroskopija uz korišćenje 3-karbamoil-proksila i farmakokinetičko modelovanje *in vivo* redukcije ovog nitroksida u glavi hSOD1 G93A pacova se pokazala kao dovoljno osetljiva i pouzdana metoda za ispitivanje promene u redoks statusu moždanog tkiva prisutne u ovom eksperimentalnom modelu ALS.

10. Oštećenje krvno-moždane barijere je prisutno u moždanom tkivu hSOD1 G93A pacova i zajedno sa promenama u redoks statusu predstavlja rani marker patoloških promena u ALS.

Prisustvo aktivacije astrocita zajedno sa povećanim markerima oksidativnog stresa u oba ispitivana moždana regiona hSOD1 G93A pacova već u presimptomatskoj fazi, promene u strukturnim i funkcionalnim karakteristikama ovih ćelija *in vitro*, kao i oštećenje krvno-moždane barijere, u čiju strukturu ove ćelije ulaze, već u presimptomatskim životinjama, ukazuju da su promene u funkciji astrocita jedan od prvih patofizioloških događaja u razvoju ALS. Detaljnije ispitivanje ovih promena bi moglo da dovede do identifikovanja primarnih mehanizama ili ranih biomarkera bolesti, dok bi ove ćelije mogle da predstavljaju jednu od glavnih meta u razvoju novih strategija za terapiju ALS.

Literatura

- Abbott NJ (2000). Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol* 20: 131-147.
- Abbott NJ (2005). Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol* 25: 5-23.
- Abbott NJ, Ronnback L and Hansson E (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7: 41-53.
- Abdulla S, Machts J, Kaufmann J, Patrick K, Kollwe K, Dengler R, Heinze HJ, Petri S, Vielhaber S and Nestor PJ (2014). Hippocampal degeneration in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 35: 2639-2645.
- Abe K, Pan LH, Watanabe M, Kato T and Itoyama Y (1995). Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 199: 152-154.
- Abe K, Pan LH, Watanabe M, Konno H, Kato T and Itoyama Y (1997). Upregulation of protein-tyrosine nitration in the anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 19: 124-128.
- Aguirre N, Beal MF, Matson WR and Bogdanov MB (2005). Increased oxidative damage to DNA in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Res* 39: 383-388.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W and Rossi FM (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 10: 1538-1543.
- Al-Sarraj S, King A, Troakes C, Smith B, Maekawa S, Bodi I, Rogelj B, Al-Chalabi A, Hortobagyi T and Shaw CE (2011). p62 positive, TDP-43 negative, neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the cerebellum and hippocampus define the pathology of C9orf72-linked FTL and MND/ALS. *Acta Neuropathol* 122: 691-702.
- Alecci M, Ferrari M, Quaresima V, Sotgiu A and Ursini CL (1994). Simultaneous 280 MHz EPR imaging of rat organs during nitroxide free radical clearance. *Biophys J* 67: 1274-1279.

- Alexianu ME, Ho BK, Mohamed AH, La Bella V, Smith RG and Appel SH (1994). The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 36: 846-858.
- Alexianu ME, Kozovska M and Appel SH (2001). Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* 57: 1282-1289.
- Almad AA, Doreswamy A, Gross SK, Richard JP, Huo Y, Haughey N and Maragakis NJ (2016). Connexin 43 in astrocytes contributes to motor neuron toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 64: 1154-1169.
- Almer G, Guegan C, Teismann P, Naini A, Rosoklija G, Hays AP, Chen C and Przedborski S (2001). Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 49: 176-185.
- Alvarez JI, Katayama T and Prat A (2013). Glial influence on the blood brain barrier. *Glia* 61: 1939-1958.
- An T, Shi P, Duan W, Zhang S, Yuan P, Li Z, Wu D, Xu Z, Li C and Guo Y (2014). Oxidative stress and autophagic alteration in brainstem of SOD1-G93A mouse model of ALS. *Mol Neurobiol* 49: 1435-1448.
- Andersen PM and Al-Chalabi A (2011). Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol* 7: 603-615.
- Andjus PR, Bataveljic D, Vanhoutte G, Mitrecic D, Pizzolante F, Djogo N, Nicaise C, Gankam Kengne F, Gangitano C, Michetti F, van der Linden A, Pochet R and Bacic G (2009). In vivo morphological changes in animal models of amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's-like disease: MRI approach. *Anat Rec (Hoboken)* 292: 1882-1892.
- Anzai K, Saito K, Takeshita K, Takahashi S, Miyazaki H, Shoji H, Lee MC, Masumizu T and Ozawa T (2003). Assessment of ESR-CT imaging by comparison with autoradiography for the distribution of a blood-brain-barrier permeable spin probe, MC-PROXYL, to rodent brain. *Magn Reson Imaging* 21: 765-772.
- Apostolski S, Nikolic J, Bugarski-Prokopljevic C, Miletic V, Pavlovic S and Filipovic S (1991). Serum and CSF immunological findings in ALS. *Acta Neurol Scand* 83: 96-98.
- Ash PE, Bieniek KF, Gendron TF, Caulfield T, Lin WL, DeJesus-Hernandez M, van Blitterswijk MM, Jansen-West K, Paul JW, 3rd, Rademakers R, Boylan KB, Dickson

- DW and Petrucelli L (2013). Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron* 77: 639-646.
- Auclair C, Voisin E (1985) Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA, editor. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton: CRC Press. 123–132.
- Bacic G, Nilges MJ, Magin RL, Walczak T and Swartz HM (1989). In vivo localized ESR spectroscopy reflecting metabolism. *Magn Reson Med* 10: 266-272.
- Bakalova R, Zhelev Z, Aoki I and Saga T (2013). Tissue redox activity as a hallmark of carcinogenesis: from early to terminal stages of cancer. *Clin Cancer Res* 19: 2503-2517.
- Baker DJ, Blackburn DJ, Keatinge M, Sokhi D, Viskaitis P, Heath PR, Ferraiuolo L, Kirby J and Shaw PJ (2015). Lysosomal and phagocytic activity is increased in astrocytes during disease progression in the SOD1 (G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci* 9: 410.
- Ballabh P, Braun A and Nedergaard M (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16: 1-13.
- Barber SC and Shaw PJ (2010). Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med* 48: 629-641.
- Basak M, Erturk M, Oflazoglu B, Ozel A, Yildiz GB and Forta H (2002). Magnetic resonance imaging in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand* 105: 395-399.
- Basso M, Pozzi S, Tortarolo M, Fiordaliso F, Bisighini C, Pasetto L, Spaltro G, Lidonnici D, Gensano F, Battaglia E, Bendotti C and Bonetto V (2013). Mutant copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) induces protein secretion pathway alterations and exosome release in astrocytes: implications for disease spreading and motor neuron pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 288: 15699-15711.
- Bataveljić D, Djogo N, Zupunski L, Bajic A, Nicaise C, Pochet R, Bacic G and Andjus PR (2009). Live monitoring of brain damage in the rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Gen Physiol Biophys* 28 Spec No: 212-218.
- Bataveljić D, Nikolic L, Milosevic M, Todorovic N and Andjus PR (2012). Changes in the astrocytic aquaporin-4 and inwardly rectifying potassium channel expression in

- the brain of the amyotrophic lateral sclerosis SOD1(G93A) rat model. *Glia* 60: 1991-2003.
- Bataveljić D, Stamenkovic S, Bacic G and Andjus PR (2011). Imaging cellular markers of neuroinflammation in the brain of the rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Physiol Hung* 98: 27-31.
- Beal MF, Ferrante RJ, Browne SE, Matthews RT, Kowall NW and Brown RH, Jr. (1997). Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 42: 644-654.
- Beckman JS, Carson M, Smith CD and Koppenol WH (1993). ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 364: 584.
- Beckman JS and Koppenol WH (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-1437.
- Beers DR, Henkel JS, Xiao Q, Zhao W, Wang J, Yen AA, Siklos L, McKercher SR and Appel SH (2006). Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16021-16026.
- Bogdanov M, Brown RH, Matson W, Smart R, Hayden D, O'Donnell H, Flint Beal M and Cudkovicz M (2000). Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radic Biol Med* 29: 652-658.
- Bogdanov MB, Ramos LE, Xu Z and Beal MF (1998). Elevated "hydroxyl radical" generation in vivo in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 71: 1321-1324.
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G and Cleveland DW (2006). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312: 1389-1392.
- Brettschneider J, Del Tredici K, Toledo JB, Robinson JL, Irwin DJ, Grossman M, Suh E, Van Deerlin VM, Wood EM, Baek Y, Kwong L, Lee EB, Elman L, McCluskey L, Fang L, Feldengut S, Ludolph AC, Lee VM, Braak H and Trojanowski JQ (2013). Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 74: 20-38.
- Brettschneider J, Libon DJ, Toledo JB, Xie SX, McCluskey L, Elman L, Geser F, Lee VM, Grossman M and Trojanowski JQ (2012). Microglial activation and TDP-43 pathology correlate with executive dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 123: 395-407.

- Bruijn LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL and Cleveland DW (1997). ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18: 327-338.
- Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW and Cleveland DW (1998). Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281: 1851-1854.
- Brylev LV, Zakharova MN, Zavalishin IA and Gulyaeva NV (2012). Disruption of Blood-Brain Barrier in Amyotrophic Lateral Sclerosis: an Update. *Neurochemical Journal* 6: 64-70.
- Bucher S, Braunstein KE, Niessen HG, Kaulisch T, Neumaier M, Boeckers TM, Stiller D and Ludolph AC (2007). Vacuolization correlates with spin-spin relaxation time in motor brainstem nuclei and behavioural tests in the transgenic G93A-SOD1 mouse model of ALS. *Eur J Neurosci* 26: 1895-1901.
- Caia GL, Efimova OV, Velayutham M, El-Mahdy MA, Abdelghany TM, Kesselring E, Petryakov S, Sun Z, Samouilov A and Zweier JL (2012). Organ specific mapping of in vivo redox state in control and cigarette smoke-exposed mice using EPR/NMR co-imaging. *J Magn Reson* 216: 21-27.
- Carri MT, Ferri A, Cozzolino M, Calabrese L and Rotilio G (2003). Neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: the role of oxidative stress and altered homeostasis of metals. *Brain Res Bull* 61: 365-374.
- Carunchio I, Mollinari C, Pieri M, Merlo D and Zona C (2008). GAB(A) receptors present higher affinity and modified subunit composition in spinal motor neurons from a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 28: 1275-1285.
- Castillo K, Nassif M, Valenzuela V, Rojas F, Matus S, Mercado G, Court FA, van Zundert B and Hetz C (2013). Trehalose delays the progression of amyotrophic lateral sclerosis by enhancing autophagy in motoneurons. *Autophagy* 9: 1308-1320.
- Chen S, Sayana P, Zhang X and Le W (2013). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Mol Neurodegener* 8: 28.

- Chung YH, Joo KM, Lee YJ and Cha CI (2003). Immunohistochemical study on the distribution of MnSOD in the central nervous system of the transgenic mice expressing a human Cu/Zn SOD mutation. *Brain Res* 990: 215-220.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH, Jr., Julien JP, Goldstein LS and Cleveland DW (2003). Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302: 113-117.
- Cleveland DW and Rothstein JD (2001). From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2: 806-819.
- Corcia P, Tauber C, Vercoillie J, Arlicot N, Prunier C, Praline J, Nicolas G, Venel Y, Hommet C, Baulieu JL, Cottier JP, Roussel C, Kassiou M, Guilloteau D and Ribeiro MJ (2012). Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7: e52941.
- Costes SV, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G and Lockett S (2004). Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J* 86: 3993-4003.
- Couet WR, Brasch RC, Sosnovsky C, Lukszo J, Prakash I, Gnewech CT and Tozer TN (1985). Influence of chemical structure of nitroxyl spin labels on their reduction by ascorbic acid. *Tetrahedron* 41: 1165-1172.
- Coyle JT and Puttfarcken P (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-695.
- Damiano M, Starkov AA, Petri S, Kipiani K, Kiaei M, Mattiazzi M, Flint Beal M and Manfredi G (2006). Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J Neurochem* 96: 1349-1361.
- Danbolt NC (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65: 1-105.
- Das MM and Svendsen CN (2015). Astrocytes show reduced support of motor neurons with aging that is accelerated in a rodent model of ALS. *Neurobiol Aging* 36: 1130-1139.
- Davis RM, Matsumoto S, Bernardo M, Sowers A, Matsumoto K, Krishna MC and Mitchell JB (2011). Magnetic resonance imaging of organic contrast agents in mice: capturing the whole-body redox landscape. *Free Radic Biol Med* 50: 459-468.

- Dehouck MP, Meresse S, Delorme P, Fruchart JC and Cecchelli R (1990). An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* 54: 1798-1801.
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J, Kouri N, Wojtas A, Sengdy P, Hsiung GY, Karydas A, Seeley WW, Josephs KA, Coppola G, Geschwind DH, Wszolek ZK, Feldman H, Knopman DS, Petersen RC, Miller BL, Dickson DW, Boylan KB, Graff-Radford NR and Rademakers R (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72: 245-256.
- Dewey CM, Cenik B, Sephton CF, Dries DR, Mayer P, 3rd, Good SK, Johnson BA, Herz J and Yu G (2011). TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor. *Mol Cell Biol* 31: 1098-1108.
- Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T and Eggan K (2007). Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10: 608-614.
- Diaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trias E, Cragolini A, Martinez-Palma L, Cassina P, Beckman J and Barbeito L (2011). Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 18126-18131.
- Donnenfeld H, Kascsak RJ and Bartfeld H (1984). Deposits of IgG and C3 in the spinal cord and motor cortex of ALS patients. *J Neuroimmunol* 6: 51-57.
- Elas M, Ichikawa K and Halpern HJ (2012). Oxidative stress imaging in live animals with techniques based on electron paramagnetic resonance. *Radiat Res* 177: 514-523.
- Engelhardt JI and Appel SH (1990). IgG reactivity in the spinal cord and motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 47: 1210-1216.
- Evans MC, Serres S, Khrapitchev AA, Stolp HB, Anthony DC, Talbot K, Turner MR and Sibson NR (2014). T(2)-weighted MRI detects presymptomatic pathology in the SOD1 mouse model of ALS. *J Cereb Blood Flow Metab* 34: 785-793.
- Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U, Kowall NW, Brown RH, Jr. and Beal MF (1997). Evidence of increased oxidative damage in

- both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 69: 2064-2074.
- Ferrari M, Colacicchi S, Gualtieri G, Santini MT and Sotgiu A (1990). Whole mouse nitroxide free radical pharmacokinetics by low frequency electron paramagnetic resonance. *Biochem Biophys Res Commun* 166: 168-173.
- Ferrucci M, Spalloni A, Bartalucci A, Cantafora E, Fulceri F, Nutini M, Longone P, Paparelli A and Fornai F (2010). A systematic study of brainstem motor nuclei in a mouse model of ALS, the effects of lithium. *Neurobiol Dis* 37: 370-383.
- Fitzmaurice PS, Shaw IC, Kleiner HE, Miller RT, Monks TJ, Lau SS, Mitchell JD and Lynch PG (1996). Evidence for DNA damage in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 19: 797-798.
- Forsberg K, Andersen PM, Marklund SL and Brannstrom T (2011). Glial nuclear aggregates of superoxide dismutase-1 are regularly present in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 121: 623-634.
- Forsberg K, Jonsson PA, Andersen PM, Bergemalm D, Graffmo KS, Hultdin M, Jacobsson J, Rosquist R, Marklund SL and Brannstrom T (2010). Novel antibodies reveal inclusions containing non-native SOD1 in sporadic ALS patients. *PLoS One* 5: e11552.
- Frakes AE, Ferraiuolo L, Haidet-Phillips AM, Schmelzer L, Braun L, Miranda CJ, Ladner KJ, Bevan AK, Foust KD, Godbout JP, Popovich PG, Guttridge DC and Kaspar BK (2014). Microglia induce motor neuron death via the classical NF-kappaB pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 81: 1009-1023.
- Fritz E, Izaurieta P, Weiss A, Mir FR, Rojas P, Gonzalez D, Rojas F, Brown RH, Jr., Madrid R and van Zundert B (2013). Mutant SOD1-expressing astrocytes release toxic factors that trigger motoneuron death by inducing hyperexcitability. *J Neurophysiol* 109: 2803-2814.
- Fuchs A, Ringer C, Bilkei-Gorzo A, Weihe E, Roeper J and Schutz B (2010). Downregulation of the potassium chloride cotransporter KCC2 in vulnerable motoneurons in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 69: 1057-1070.

- Fujii HG, Sato-Akaba H, Emoto MC, Itoh K, Ishihara Y and Hirata H (2013). Noninvasive mapping of the redox status in septic mouse by in vivo electron paramagnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging* 31: 130-138.
- Funakoshi T, Kuromatsu K and Kojima S (1996). Effect of nickel on enzymatic activities in the mouse pancreas. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 92: 245-252.
- Funfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, Brinkmann BG, Kassmann CM, Tzvetanova ID, Mobius W, Diaz F, Meijer D, Suter U, Hamprecht B, Sereda MW, Moraes CT, Frahm J, Goebbels S and Nave KA (2012). Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 485: 517-521.
- Gallez B, Bacic G, Goda F, Jiang J, O'Hara JA, Dunn JF and Swartz HM (1996). Use of nitroxides for assessing perfusion, oxygenation, and viability of tissues: in vivo EPR and MRI studies. *Magn Reson Med* 35: 97-106.
- Garbuzova-Davis S, Haller E, Saporta S, Kolomey I, Nicosia SV and Sanberg PR (2007). Ultrastructure of blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in SOD1 mice modeling ALS. *Brain Res* 1157: 126-137.
- Garbuzova-Davis S and Sanberg PR (2014). Blood-CNS Barrier Impairment in ALS patients versus an animal model. *Front Cell Neurosci* 8: 21.
- Garbuzova-Davis S, Saporta S, Haller E, Kolomey I, Bennett SP, Potter H and Sanberg PR (2007). Evidence of compromised blood-spinal cord barrier in early and late symptomatic SOD1 mice modeling ALS. *PLoS One* 2: e1205.
- Goldstein S, Merenyi G, Russo A and Samuni A (2003). The role of oxoammonium cation in the SOD-mimic activity of cyclic nitroxides. *J Am Chem Soc* 125: 789-795.
- Goldstein S and Samuni A (2007). Kinetics and mechanism of peroxy radical reactions with nitroxides. *J Phys Chem A* 111: 1066-1072.
- Goldstein S, Samuni A, Hideg K and Merenyi G (2006). Structure-activity relationship of cyclic nitroxides as SOD mimics and scavengers of nitrogen dioxide and carbonate radicals. *J Phys Chem A* 110: 3679-3685.
- Goldstein S, Samuni A and Merenyi G (2004). Reactions of nitric oxide, peroxy nitrite, and carbonate radicals with nitroxides and their corresponding oxoammonium cations. *Chem Res Toxicol* 17: 250-257.

- Gomes C, Keller S, Altevogt P and Costa J (2007). Evidence for secretion of Cu,Zn superoxide dismutase via exosomes from a cell model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 428: 43-46.
- Gordon S and Martinez FO (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32: 593-604.
- Gowing G, Philips T, Van Wijmeersch B, Audet JN, Dewil M, Van Den Bosch L, Billiau AD, Robberecht W and Julien JP (2008). Ablation of proliferating microglia does not affect motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase. *J Neurosci* 28: 10234-10244.
- Grodd W, Paajanen H, Eriksson UG, Revel D, Terrier F and Brasch RC (1987). Comparison of ionic and non-ionic nitroxide spin labels for urographic enhancement in magnetic resonance imaging. *Acta Radiol* 28: 593-600.
- Grosskreutz J, Van Den Bosch L and Keller BU (2010). Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Calcium* 47: 165-174.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliando J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX and et al. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264: 1772-1775.
- Hadzhieva M, Kirches E and Mawrin C (2014). Review: iron metabolism and the role of iron in neurodegenerative disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40: 240-257.
- Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A, Song S, Likhite S, Murtha MJ, Foust KD, Rao M, Eagle A, Kammesheidt A, Christensen A, Mendell JR, Burghes AH and Kaspar BK (2011). Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol* 29: 824-828.
- Hall ED, Andrus PK, Oostveen JA, Fleck TJ and Gurney ME (1998). Relationship of oxygen radical-induced lipid peroxidative damage to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *J Neurosci Res* 53: 66-77.
- Han JY, Takeshita K and Utsumi H (2001). Noninvasive detection of hydroxyl radical generation in lung by diesel exhaust particles. *Free Radic Biol Med* 30: 516-525.
- Harras MM, Marden JJ, Zhou W, Zhang Y, Williams A, Sharov VS, Nelson K, Luo M, Paulson H, Schoneich C and Engelhardt JF (2008). SOD1 mutations disrupt redox-

- sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J Clin Invest* 118: 659-670.
- He G, Samouilov A, Kuppusamy P and Zweier JL (2002). In vivo imaging of free radicals: applications from mouse to man. *Mol Cell Biochem* 234-235: 359-367.
- Henkel JS, Beers DR, Siklos L and Appel SH (2006). The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS. *Mol Cell Neurosci* 31: 427-437.
- Henkel JS, Beers DR, Wen S, Bowser R and Appel SH (2009). Decreased mRNA expression of tight junction proteins in lumbar spinal cords of patients with ALS. *Neurology* 72: 1614-1616.
- Henkel JS, Engelhardt JI, Siklos L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, Goodman JC, Siddique T, Beers DR and Appel SH (2004). Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol* 55: 221-235.
- Hensley K, Fedynyshyn J, Ferrell S, Floyd RA, Gordon B, Grammas P, Hamdheydari L, Mhatre M, Mou S, Pye QN, Stewart C, West M, West S and Williamson KS (2003). Message and protein-level elevation of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and TNF alpha-modulating cytokines in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 14: 74-80.
- Hensley K, Floyd RA, Gordon B, Mou S, Pye QN, Stewart C, West M and Williamson K (2002). Temporal patterns of cytokine and apoptosis-related gene expression in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 82: 365-374.
- Higgins CM, Jung C, Ding H and Xu Z (2002). Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J Neurosci* 22: RC215.
- Hiramatsu M, Oikawa K, Noda H, Mori A, Ogata T and Kamada H (1995). Free radical imaging by electron spin resonance computed tomography in rat brain. *Brain Res* 697: 44-47.
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW and Rothstein JD (2002). Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-

- mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1604-1609.
- Hozumi I, Hasegawa T, Honda A, Ozawa K, Hayashi Y, Hashimoto K, Yamada M, Koumura A, Sakurai T, Kimura A, Tanaka Y, Satoh M and Inuzuka T (2011). Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci* 303: 95-99.
- Huber JD, Egleton RD and Davis TP (2001). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* 24: 719-725.
- Hyodo F, Chuang KH, Goloshevsky AG, Sulima A, Griffiths GL, Mitchell JB, Koretsky AP and Krishna MC (2008). Brain redox imaging using blood-brain barrier-permeable nitroxide MRI contrast agent. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 1165-1174.
- Hyodo F, Matsumoto K, Matsumoto A, Mitchell JB and Krishna MC (2006). Probing the intracellular redox status of tumors with magnetic resonance imaging and redox-sensitive contrast agents. *Cancer Res* 66: 9921-9928.
- Hyodo F, Yasukawa K, Yamada K and Utsumi H (2006). Spatially resolved time-course studies of free radical reactions with an EPRI/MRI fusion technique. *Magn Reson Med* 56: 938-943.
- Iannone A, Hu HP, Tomasi A, Vannini V and Swartz HM (1989). Metabolism of aqueous soluble nitroxides in hepatocytes: effects of cell integrity, oxygen, and structure of nitroxides. *Biochim Biophys Acta* 991: 90-96.
- Ichikawa K, Sato Y, Kondo H and Utsumi H (2006). An ESR contrast agent is transported to rat liver through organic anion transporter. *Free Radic Res* 40: 403-408.
- Ignjatović A, Stević Z, Lavrnić D, Nikolić-Kokić A, Blagojević D, Spasić M and Spasojević I (2012). Inappropriately chelated iron in the cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler* 13: 357-362.
- Ignjatović A, Stević Z, Lavrnić S, Daković M and Bačić G (2013). Brain iron MRI: a biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *J Magn Reson Imaging* 38: 1472-1479.
- Ihara Y, Nobukuni K, Takata H and Hayabara T (2005). Oxidative stress and metal content in blood and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients with and without a Cu, Zn-superoxide dismutase mutation. *Neurol Res* 27: 105-108.

- Ikeda K, Hirayama T, Takazawa T, Kawabe K and Iwasaki Y (2012). Relationships between disease progression and serum levels of lipid, urate, creatinine and ferritin in Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis: a cross-sectional study. *Intern Med* 51: 1501-1508.
- Ip P, Mulligan VK and Chakrabartty A (2011). ALS-causing SOD1 mutations promote production of copper-deficient misfolded species. *J Mol Biol* 409: 839-852.
- Ishida S, Matsumoto S, Yokoyama H, Mori N, Kumashiro H, Tsuchihashi N, Ogata T, Yamada M, Ono M, Kitajima T and et al. (1992). An ESR-CT imaging of the head of a living rat receiving an administration of a nitroxide radical. *Magn Reson Imaging* 10: 109-114.
- Jaarsma D, Rognoni F, van Duijn W, Verspaget HW, Haasdijk ED and Holstege JC (2001). CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol* 102: 293-305.
- Jaarsma D, Teuling E, Haasdijk ED, De Zeeuw CI and Hoogenraad CC (2008). Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *J Neurosci* 28: 2075-2088.
- Jellinger KA (2013). The relevance of metals in the pathophysiology of neurodegeneration, pathological considerations. *Int Rev Neurobiol* 110: 1-47.
- Jelsone-Swain L, Persad C, Votruba KL, Weisenbach SL, Johnson T, Gruis KL and Welsh RC (2012). The Relationship between Depressive Symptoms, Disease State, and Cognition in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Psychol* 3: 542.
- Jonsson PA, Bergemalm D, Andersen PM, Gredal O, Brannstrom T and Marklund SL (2008). Inclusions of amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase in ventral horns, liver, and kidney. *Ann Neurol* 63: 671-675.
- Kadoyama K, Funakoshi H, Ohya W and Nakamura T (2007). Hepatocyte growth factor (HGF) attenuates gliosis and motoneuronal degeneration in the brainstem motor nuclei of a transgenic mouse model of ALS. *Neurosci Res* 59: 446-456.
- Kang SH, Li Y, Fukaya M, Lorenzini I, Cleveland DW, Ostrow LW, Rothstein JD and Bergles DE (2013). Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 16: 571-579.

- Kanias GD and Kapaki E (1997). Trace elements, age, and sex in amyotrophic lateral sclerosis disease. *Biol Trace Elem Res* 56: 187-201.
- Kashlan ON, Kashlan BN, Oh SS, McGinley LM, Chen KS, Kupfer R, Erman A, Sakowski SA and Feldman EL (2015). Histological Bulbar Manifestations in the ALS Rat. *Neurodegener Dis* 15: 121-126.
- Kaur SJ, McKeown SR and Rashid S (2016). Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene* 577: 109-118.
- Kawamata H, Ng SK, Diaz N, Burstein S, Morel L, Osgood A, Sider B, Higashimori H, Haydon PG, Manfredi G and Yang Y (2014). Abnormal intracellular calcium signaling and SNARE-dependent exocytosis contributes to SOD1G93A astrocyte-mediated toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 34: 2331-2348.
- Kawamata T, Akiyama H, Yamada T and McGeer PL (1992). Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol* 140: 691-707.
- Keana JF, Pou S and Rosen GM (1987). Nitroxides as potential contrast enhancing agents for MRI application: influence of structure on the rate of reduction by rat hepatocytes, whole liver homogenate, subcellular fractions, and ascorbate. *Magn Reson Med* 5: 525-536.
- Keller AF, Gravel M and Kriz J (2009). Live imaging of amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: disease onset is characterized by marked induction of GFAP in Schwann cells. *Glia* 57: 1130-1142.
- Kim J, Kim TY, Hwang JJ, Lee JY, Shin JH, Gwag BJ and Koh JY (2009). Accumulation of labile zinc in neurons and astrocytes in the spinal cords of G93A SOD-1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 34: 221-229.
- Kocherginsky N, Swartz HM (1995). Nitroxide spin labels: reactions in biology and chemistry, CRC Press.
- Krishna MC, Grahame DA, Samuni A, Mitchell JB and Russo A (1992). Oxoammonium cation intermediate in the nitroxide-catalyzed dismutation of superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5537-5541.
- Krishna MC, Samuni A, Taira J, Goldstein S, Mitchell JB and Russo A (1996). Stimulation by nitroxides of catalase-like activity of heme proteins. Kinetics and mechanism. *J Biol Chem* 271: 26018-26025.

- Kushner PD, Stephenson DT and Wright S (1991). Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 50: 263-277.
- Kwan JY, Jeong SY, Van Gelderen P, Deng HX, Quezado MM, Danielian LE, Butman JA, Chen L, Bayat E, Russell J, Siddique T, Duyn JH, Rouault TA and Floeter MK (2012). Iron accumulation in deep cortical layers accounts for MRI signal abnormalities in ALS: correlating 7 tesla MRI and pathology. *PLoS One* 7: e35241.
- Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE and Brown RH, Jr. (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323: 1205-1208.
- Leal SS, Cardoso I, Valentine JS and Gomes CM (2013). Calcium ions promote superoxide dismutase 1 (SOD1) aggregation into non-fibrillar amyloid: a link to toxic effects of calcium overload in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)? *J Biol Chem* 288: 25219-25228.
- Lee JK, Shin JH, Lee JE and Choi EJ (2015). Role of autophagy in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1852: 2517-2524.
- Lee MC, Shoji H, Miyazaki H, Yoshino F, Hori N, Toyoda M, Ikeda Y, Anzai K, Ikota N and Ozawa T (2004). Assessment of oxidative stress in the spontaneously hypertensive rat brain using electron spin resonance (ESR) imaging and in vivo L-Band ESR. *Hypertens Res* 27: 485-492.
- Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ and Rothstein JD (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487: 443-448.
- Lelie HL, Liba A, Bourassa MW, Chattopadhyay M, Chan PK, Gralla EB, Miller LM, Borchelt DR, Valentine JS and Whitelegge JP (2011). Copper and zinc metallation status of copper-zinc superoxide dismutase from amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice. *J Biol Chem* 286: 2795-2806.

- Lenaz G (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1366: 53-67.
- Leonardi A, Abbruzzese G, Arata L, Cocito L and Vische M (1984). Cerebrospinal fluid (CSF) findings in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 231: 75-78.
- Lepore AC, Dejea C, Carmen J, Rauck B, Kerr DA, Sofroniew MV and Maragakis NJ (2008). Selective ablation of proliferating astrocytes does not affect disease outcome in either acute or chronic models of motor neuron degeneration. *Exp Neurol* 211: 423-432.
- Li C, Xu WC, Xie ZS, Pan K, Hu J, Chen J, Pang DW, Yang FQ and Liang Y (2013). Cupric ions induce the oxidation and trigger the aggregation of human superoxide dismutase 1. *PLoS One* 8: e65287.
- Ling SC, Polymenidou M and Cleveland DW (2013). Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 79: 416-438.
- Liu D, Wen J, Liu J and Li L (1999). The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids. *FASEB J* 13: 2318-2328.
- Liu Y, Brooks BR, Taniguchi N and Hartmann HA (1998). CuZnSOD and MnSOD immunoreactivity in brain stem motor neurons from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neuropathol* 95: 63-70.
- Lovejoy DB and Guillemin GJ (2014). The potential for transition metal-mediated neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Front Aging Neurosci* 6: 173.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Lyons TJ, Liu H, Goto JJ, Nersissian A, Roe JA, Graden JA, Cafe C, Ellerby LM, Bredesen DE, Gralla EB and Valentine JS (1996). Mutations in copper-zinc superoxide dismutase that cause amyotrophic lateral sclerosis alter the zinc binding site and the redox behavior of the protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12240-12244.
- Mahoney DJ, Kaczor JJ, Bourgeois J, Yasuda N and Tarnopolsky MA (2006). Oxidative stress and antioxidant enzyme upregulation in SOD1-G93A mouse skeletal muscle. *Muscle Nerve* 33: 809-816.

- Maragakis NJ and Rothstein JD (2006). Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2: 679-689.
- Matsumoto A, Matsumoto K, Matsumoto S, Hyodo F, Sowers AL, Koscielniak JW, Devasahayam N, Subramanian S, Mitchell JB and Krishna MC (2011). Intracellular hypoxia of tumor tissue estimated by noninvasive electron paramagnetic resonance oximetry technique using paramagnetic probes. *Biol Pharm Bull* 34: 142-145.
- Matsumoto K, Hyodo F, Matsumoto A, Koretsky AP, Sowers AL, Mitchell JB and Krishna MC (2006). High-resolution mapping of tumor redox status by magnetic resonance imaging using nitroxides as redox-sensitive contrast agents. *Clin Cancer Res* 12: 2455-2462.
- Matsumoto K, Krishna MC and Mitchell JB (2004). Novel pharmacokinetic measurement using electron paramagnetic resonance spectroscopy and simulation of in vivo decay of various nitroxyl spin probes in mouse blood. *J Pharmacol Exp Ther* 310: 1076-1083.
- Matsumoto K, Yamasaki T, Nakamura M, Ishikawa J, Ueno M, Nakanishi I, Sekita A, Ozawa Y, Kamada T, Aoki I and Yamada K (2016). Brain contrasting ability of blood-brain-barrier-permeable nitroxyl contrast agents for magnetic resonance redox imaging. *Magn Reson Med* 76: 935-945.
- McCarthy KD and de Vellis J (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85: 890-902.
- McCord JM and Fridovich I (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055.
- Meissner F, Molawi K and Zychlinsky A (2010). Mutant superoxide dismutase 1-induced IL-1 β accelerates ALS pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 13046-13050.
- Meyer K, Ferraiuolo L, Miranda CJ, Likhite S, McElroy S, Renusch S, Ditsworth D, Lagier-Tourenne C, Smith RA, Ravits J, Burghes AH, Shaw PJ, Cleveland DW, Kolb SJ and Kaspar BK (2014). Direct conversion of patient fibroblasts demonstrates non-cell autonomous toxicity of astrocytes to motor neurons in familial and sporadic ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 829-832.
- Miana-Mena FJ, Gonzalez-Mingot C, Larrode P, Munoz MJ, Olivan S, Fuentes-Broto L, Martinez-Ballarín E, Reiter RJ, Osta R and Garcia JJ (2011). Monitoring systemic

- oxidative stress in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 258: 762-769.
- Ming LJ and Valentine JS (2014). Insights into SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis from NMR studies of Ni(2+)- and other metal-ion-substituted wild-type copper-zinc superoxide dismutases. *J Biol Inorg Chem* 19: 647-657.
- Miura Y, Utsumi H and Hamada A (1992). Effects of inspired oxygen concentration on in vivo redox reaction of nitroxide radicals in whole mice. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 1108-1114.
- Miyazaki K, Ohta Y, Nagai M, Morimoto N, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Matsuura T and Abe K (2011). Disruption of neurovascular unit prior to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res* 89: 718-728.
- Mohammadi B, Krampfl K, Moschref H, Dengler R and Bufler J (2001). Interaction of the neuroprotective drug riluzole with GABA(A) and glycine receptor channels. *Eur J Pharmacol* 415: 135-140.
- Mori K, Lammich S, Mackenzie IR, Forne I, Zilow S, Kretzschmar H, Edbauer D, Janssens J, Kleinberger G, Cruts M, Herms J, Neumann M, Van Broeckhoven C, Arzberger T and Haass C (2013). hnRNP A3 binds to GGGGCC repeats and is a constituent of p62-positive/TDP43-negative inclusions in the hippocampus of patients with C9orf72 mutations. *Acta Neuropathol* 125: 413-423.
- Mosser DM and Edwards JP (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958-969.
- Mulligan VK, Kerman A, Laister RC, Sharda PR, Arslan PE and Chakrabartty A (2012). Early steps in oxidation-induced SOD1 misfolding: implications for non-amyloid protein aggregation in familial ALS. *J Mol Biol* 421: 631-652.
- Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H and Przedborski S (2007). Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 10: 615-622.
- Nagy D, Kato T and Kushner PD (1994). Reactive astrocytes are widespread in the cortical gray matter of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res* 38: 336-347.
- Nakagawa Y and Chiba K (2014). Role of microglial m1/m2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharmaceuticals (Basel)* 7: 1028-1048.

- Navarro-Gonzalvez JA, Garcia-Benayas C and Arenas J (1998). Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 44: 679-681.
- Nguyen MD, Julien JP and Rivest S (2001). Induction of proinflammatory molecules in mice with amyotrophic lateral sclerosis: no requirement for proapoptotic interleukin-1beta in neurodegeneration. *Ann Neurol* 50: 630-639.
- Nicaise C, Mitrecic D, Demetter P, De Decker R, Authelet M, Boom A and Pochet R (2009). Impaired blood-brain and blood-spinal cord barriers in mutant SOD1-linked ALS rat. *Brain Res* 1301: 152-162.
- Niessen HG, Angenstein F, Sander K, Kunz WS, Teuchert M, Ludolph AC, Heinze HJ, Scheich H and Vielhaber S (2006). In vivo quantification of spinal and bulbar motor neuron degeneration in the G93A-SOD1 transgenic mouse model of ALS by T2 relaxation time and apparent diffusion coefficient. *Exp Neurol* 201: 293-300.
- Nimchinsky EA, Young WG, Yeung G, Shah RA, Gordon JW, Bloom FE, Morrison JH and Hof PR (2000). Differential vulnerability of oculomotor, facial, and hypoglossal nuclei in G86R superoxide dismutase transgenic mice. *J Comp Neurol* 416: 112-125.
- Nishino N, Yasui H and Sakurai H (1999). In vivo L-band ESR and quantitative pharmacokinetic analysis of stable spin probes in rats and mice. *Free Radic Res* 31: 35-51.
- Ohgomori T, Yamada J, Takeuchi H, Kadomatsu K and Jinno S (2016). Comparative morphometric analysis of microglia in the spinal cord of SOD1(G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 43: 1340-1351.
- Okajo A, Matsumoto K, Mitchell JB, Krishna MC and Endo K (2006). Competition of nitroxyl contrast agents as an in vivo tissue redox probe: comparison of pharmacokinetics by the bile flow monitoring (BFM) and blood circulating monitoring (BCM) methods using X-band EPR and simulation of decay profiles. *Magn Reson Med* 56: 422-431.
- Oller-Salvia B, Sanchez-Navarro M, Giralt E and Teixido M (2016). Blood-brain barrier shuttle peptides: an emerging paradigm for brain delivery. *Chem Soc Rev* 45: 4690-4707.
- Ostachowicz B, Lankosz M, Tomik B, Adamek D, Wobruschek P, Strelciak C and Kregsamer P (2006). Analysis of some chosen elements of cerebrospinal fluid and

- serum in amyotrophic lateral sclerosis patients by total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 61: 1210-1213.
- Parakh S and Atkin JD (2016). Protein folding alterations in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* 1648: 633-649.
- Pardridge WM, Eisenberg J and Yang J (1985). Human blood-brain barrier insulin receptor. *J Neurochem* 44: 1771-1778.
- Pasinelli P, Belford ME, Lennon N, Bacskai BJ, Hyman BT, Trotti D and Brown RH, Jr. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* 43: 19-30.
- Paxinos G, Watson C (2006). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th ed). Academic Press, New York, NY.
- Pellerin L and Magistretti PJ (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10625-10629.
- Petri S, Calingasan NY, Alsaied OA, Wille E, Kiaei M, Friedman JE, Baranova O, Chavez JC and Beal MF (2007). The lipophilic metal chelators DP-109 and DP-460 are neuroprotective in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 102: 991-1000.
- Phatnani HP, Guarnieri P, Friedman BA, Carrasco MA, Muratet M, O'Keeffe S, Nwakeze C, Pauli-Behn F, Newberry KM, Meadows SK, Tapia JC, Myers RM and Maniatis T (2013). Intricate interplay between astrocytes and motor neurons in ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E756-765.
- Philips T, Bento-Abreu A, Nonneman A, Haeck W, Staats K, Geelen V, Hersmus N, Kusters B, Van Den Bosch L, Van Damme P, Richardson WD and Robberecht W (2013). Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 136: 471-482.
- Philips T and Robberecht W (2011). Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol* 10: 253-263.
- Philips T and Rothstein JD (2014). Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 262 Pt B: 111-120.

- Phukan J, Elamin M, Bede P, Jordan N, Gallagher L, Byrne S, Lynch C, Pender N and Hardiman O (2012). The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83: 102-108.
- Poloni M, Facchetti D, Mai R, Micheli A, Agnoletti L, Francolini G, Mora G, Camana C, Mazzini L and Bachetti T (2000). Circulating levels of tumour necrosis factor- α and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 287: 211-214.
- Popović-Bijelić A, Mojović M, Stamenković S, Jovanović M, Selaković V, Andjus P and Bačić G (2016). Iron-sulfur cluster damage by the superoxide radical in neural tissues of the SOD1(G93A) ALS rat model. *Free Radic Biol Med* 96: 313-322.
- Pramatarova A, Laganieri J, Roussel J, Brisebois K and Rouleau GA (2001). Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* 21: 3369-3374.
- Pryor WA and Squadrito GL (1995). The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 268: L699-722.
- Pun PB, Lu J and Moochhala S (2009). Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radic Res* 43: 348-364.
- Rafiki A, Boulland JL, Halestrap AP, Ottersen OP and Bergersen L (2003). Highly differential expression of the monocarboxylate transporters MCT2 and MCT4 in the developing rat brain. *Neuroscience* 122: 677-688.
- Ramsauer M, Krause D and Dermietzel R (2002). Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *FASEB J* 16: 1274-1276.
- Rehncrona S, Smith DS, Akesson B, Westerberg E and Siesjo BK (1980). Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺- and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *J Neurochem* 34: 1630-1638.
- Renton AE, Majounie E, Waite A, Simon-Sanchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L, Kalimo H, Paetau A, Abramzon Y, Remes AM, Kaganovich A, Scholz SW, Duckworth J, Ding J, Harmer DW, Hernandez DG, Johnson JO, Mok K, Ryten M, Trabzuni D, Guerreiro RJ, Orrell RW, Neal J, Murray A, Pearson J, Jansen IE, Sondervan D, Seelaar H, Blake D, Young K, Halliwell N, Callister JB, Toulson G, Richardson A, Gerhard A, Snowden J, Mann D, Neary D, Nalls MA, Peuralinna T, Jansson L, Isoviita VM, Kaivorinne AL, Holtta-

- Vuori M, Ikonen E, Sulkava R, Benatar M, Wu J, Chio A, Restagno G, Borghero G, Sabatelli M, Consortium I, Heckerman D, Rogaeva E, Zinman L, Rothstein JD, Sendtner M, Drepper C, Eichler EE, Alkan C, Abdullaev Z, Pack SD, Dutra A, Pak E, Hardy J, Singleton A, Williams NM, Heutink P, Pickering-Brown S, Morris HR, Tienari PJ and Traynor BJ (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72: 257-268.
- Robberecht W and Philips T (2013). The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 14: 248-264.
- Roos PM, Lierhagen S, Flaten TP, Syversen T, Vesterberg O and Nordberg M (2012). Manganese in cerebrospinal fluid and blood plasma of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Biol Med (Maywood)* 237: 803-810.
- Roos PM, Vesterberg O, Syversen T, Flaten TP and Nordberg M (2013). Metal concentrations in cerebrospinal fluid and blood plasma from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Biol Trace Elem Res* 151: 159-170.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX and et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP and Welty DF (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16: 675-686.
- Rothstein JD, Martin LJ and Kuncl RW (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 326: 1464-1468.
- Rowland LP and Shneider NA (2001). Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344: 1688-1700.
- Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, Janatpour M, Liaw CW, Manning K, Morales J and et al. (1991). A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 115: 1725-1735.
- Salditt T and Dučić T (2014). X-Ray Microscopy for Neuroscience: Novel Opportunities by Coherent Optics. *Super-Resolution Microscopy Techniques in the*

- Neurosciences. E. F. Fornasiero and S. O. Rizzoli. Totowa, NJ, Humana Press: 257-290.
- Salnikow K, Kluz T and Costa M (1999). Role of Ca(2+) in the regulation of nickel-inducible Cap43 gene expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 160: 127-132.
- Samuni A, Goldstein S, Russo A, Mitchell JB, Krishna MC and Neta P (2002). Kinetics and mechanism of hydroxyl radical and OH-adduct radical reactions with nitroxides and with their hydroxylamines. *J Am Chem Soc* 124: 8719-8724.
- Sanagi T, Yuasa S, Nakamura Y, Suzuki E, Aoki M, Warita H, Itoyama Y, Uchino S, Kohsaka S and Ohsawa K (2010). Appearance of phagocytic microglia adjacent to motoneurons in spinal cord tissue from a presymptomatic transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res* 88: 2736-2746.
- Sano H, Matsumoto K and Utsumi H (1997). Synthesis and imaging of blood-brain-barrier permeable nitroxyl-probes for free radical reactions in brain of living mice. *Biochem Mol Biol Int* 42: 641-647.
- Saxena S, Cabuy E and Caroni P (2009). A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci* 12: 627-636.
- Schiffer D, Cordera S, Cavalla P and Migheli A (1996). Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 139 Suppl: 27-33.
- Schreiber H, Gaigalat T, Wiedemuth-Catrinescu U, Graf M, Uttner I, Mucche R and Ludolph AC (2005). Cognitive function in bulbar- and spinal-onset amyotrophic lateral sclerosis. A longitudinal study in 52 patients. *J Neurol* 252: 772-781.
- Schutz B (2005). Imbalanced excitatory to inhibitory synaptic input precedes motor neuron degeneration in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 20: 131-140.
- Seetharaman SV, Prudencio M, Karch C, Holloway SP, Borchelt DR and Hart PJ (2009). Immature copper-zinc superoxide dismutase and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Biol Med (Maywood)* 234: 1140-1154.
- Shaw BF and Valentine JS (2007). How do ALS-associated mutations in superoxide dismutase 1 promote aggregation of the protein? *Trends Biochem Sci* 32: 78-85.
- Shaw PJ, Ince PG, Falkous G and Mantle D (1995). Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann Neurol* 38: 691-695.

- Shibata N, Nagai R, Uchida K, Horiuchi S, Yamada S, Hirano A, Kawaguchi M, Yamamoto T, Sasaki S and Kobayashi M (2001). Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res* 917: 97-104.
- Silverman JM, Fernando SM, Grad LI, Hill AF, Turner BJ, Yerbury JJ and Cashman NR (2016). Disease Mechanisms in ALS: Misfolded SOD1 Transferred Through Exosome-Dependent and Exosome-Independent Pathways. *Cell Mol Neurobiol* 36: 377-381.
- Simpson EP, Henry YK, Henkel JS, Smith RG and Appel SH (2004). Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology* 62: 1758-1765.
- Smith AP and Lee NM (2007). Role of zinc in ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 8: 131-143.
- Smith RG, Henry YK, Mattson MP and Appel SH (1998). Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 44: 696-699.
- Soo KY, Halloran M, Sundaramoorthy V, Parakh S, Toth RP, Southam KA, McLean CA, Lock P, King A, Farg MA and Atkin JD (2015). Rab1-dependent ER-Golgi transport dysfunction is a common pathogenic mechanism in SOD1, TDP-43 and FUS-associated ALS. *Acta Neuropathol* 130: 679-697.
- Spears JW, Harvey RW and Samsell LJ (1986). Effects of dietary nickel and protein on growth, nitrogen metabolism and tissue concentrations of nickel, iron, zinc, manganese and copper in calves. *J Nutr* 116: 1873-1882.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Belleruche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G and Shaw CE (2008). TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319: 1668-1672.
- Stieber A, Gonatas JO and Gonatas NK (2000). Aggregates of mutant protein appear progressively in dendrites, in periaxonal processes of oligodendrocytes, and in neuronal and astrocytic perikarya of mice expressing the SOD1(G93A) mutation of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 177: 114-123.

- Sun M and Zigman S (1978). An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem* 90: 81-89.
- Swartz HM, Sentjurs M and Morse PD, 2nd (1986). Cellular metabolism of water-soluble nitroxides: effect on rate of reduction of cell/nitroxide ratio, oxygen concentrations and permeability of nitroxides. *Biochim Biophys Acta* 888: 82-90.
- Tafari F, Ronchi D, Magri F, Comi GP and Corti S (2015). SOD1 misplacing and mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. *Front Cell Neurosci* 9: 336.
- Takeda T, Uchihara T, Arai N, Mizutani T and Iwata M (2009). Progression of hippocampal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis with or without memory impairment: distinction from Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 117: 35-44.
- Takeda T, Uchihara T, Mochizuki Y, Mizutani T and Iwata M (2007). Memory deficits in amyotrophic lateral sclerosis patients with dementia and degeneration of the perforant pathway A clinicopathological study. *J Neurol Sci* 260: 225-230.
- Takeshita K, Chi C, Hirata H, Ono M and Ozawa T (2006). In vivo generation of free radicals in the skin of live mice under ultraviolet light, measured by L-band EPR spectroscopy. *Free Radic Biol Med* 40: 876-885.
- Tateno M, Sadakata H, Tanaka M, Itohara S, Shin RM, Miura M, Masuda M, Aosaki T, Urushitani M, Misawa H and Takahashi R (2004). Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. *Hum Mol Genet* 13: 2183-2196.
- Tawfik VL, Regan MR, Haenggeli C, Lacroix-Fralish ML, Nutile-McMenemy N, Perez N, Rothstein JD and DeLeo JA (2008). Propentofylline-induced astrocyte modulation leads to alterations in glial glutamate promoter activation following spinal nerve transection. *Neuroscience* 152: 1086-1092.
- Todhunter EN and Mc MT (1946). The ascorbic acid content of whole blood plasma of normal rats with evidence of a sex difference. *J Nutr* 31: 573-580.
- Tokuda E, Okawa E, Watanabe S and Ono S (2014). Overexpression of metallothionein-I, a copper-regulating protein, attenuates intracellular copper dyshomeostasis and extends lifespan in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase-1. *Hum Mol Genet* 23: 1271-1285.

- Tokuda E, Okawa E, Watanabe S, Ono S and Marklund SL (2013). Dysregulation of intracellular copper homeostasis is common to transgenic mice expressing human mutant superoxide dismutase-1s regardless of their copper-binding abilities. *Neurobiol Dis* 54: 308-319.
- Tokuda E, Ono S, Ishige K, Watanabe S, Okawa E, Ito Y and Suzuki T (2008). Ammonium tetrathiomolybdate delays onset, prolongs survival, and slows progression of disease in a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 213: 122-128.
- Tomik B, Chwiej J, Szczerbowska-Boruchowska M, Lankosz M, Wojcik S, Adamek D, Falkenberg G, Bohic S, Simionovici A, Stegowski Z and Szczudlik A (2006). Implementation of X-ray fluorescence microscopy for investigation of elemental abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem Res* 31: 321-331.
- Tradewell ML, Cooper LA, Minotti S and Durham HD (2011). Calcium dysregulation, mitochondrial pathology and protein aggregation in a culture model of amyotrophic lateral sclerosis: mechanistic relationship and differential sensitivity to intervention. *Neurobiol Dis* 42: 265-275.
- Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN and Banati RB (2004). Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* 15: 601-609.
- Urushitani M, Sik A, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R and Julien JP (2006). Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 9: 108-118.
- Valentine JS, Doucette PA and Zittin Potter S (2005). Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annu Rev Biochem* 74: 563-593.
- Valgimigli L, Pedulli GF and Paolini M (2001). Measurement of oxidative stress by EPR radical-probe technique. *Free Radic Biol Med* 31: 708-716.
- Van Damme P, Callewaert G, Eggermont J, Robberecht W and Van Den Bosch L (2003). Chloride influx aggravates Ca²⁺-dependent AMPA receptor-mediated motoneuron death. *J Neurosci* 23: 4942-4950.

- Van Den Bosch L, Van Damme P, Bogaert E and Robberecht W (2006). The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762: 1068-1082.
- van Es MA, Hardiman O, Chio A, Al-Chalabi A, Pasterkamp RJ, Veldink JH and van den Berg LH (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*.
- Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P, Ganesalingam J, Williams KL, Tripathi V, Al-Saraj S, Al-Chalabi A, Leigh PN, Blair IP, Nicholson G, de Belleruche J, Gallo JM, Miller CC and Shaw CE (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323: 1208-1211.
- Vianello F, Momo F, Scarpa M and Rigo A (1995). Kinetics of nitroxide spin label removal in biological systems: an in vitro and in vivo ESR study. *Magn Reson Imaging* 13: 219-226.
- von Lewinski F and Keller BU (2005). Ca²⁺, mitochondria and selective motoneuron vulnerability: implications for ALS. *Trends Neurosci* 28: 494-500.
- Vonk WI and Klomp LW (2008). Role of transition metals in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Soc Trans* 36: 1322-1328.
- Vucic S, Rothstein JD and Kiernan MC (2014). Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies. *Trends Neurosci* 37: 433-442.
- Wagner DC, Scheibe J, Glocke I, Weise G, Deten A, Boltze J and Kranz A (2013). Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 73: 79-87.
- Wang L, Gutmann DH and Roos RP (2011). Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. *Hum Mol Genet* 20: 286-293.
- Wang L, Sharma K, Grisotti G and Roos RP (2009). The effect of mutant SOD1 dismutase activity on non-cell autonomous degeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 35: 234-240.
- Wang Q, Johnson JL, Agar NY and Agar JN (2008). Protein aggregation and protein instability govern familial amyotrophic lateral sclerosis patient survival. *PLoS Biol* 6: e170.

- Wang Q, Zhang X, Chen S, Zhang X, Zhang S, Youdium M and Le W (2011). Prevention of motor neuron degeneration by novel iron chelators in SOD1(G93A) transgenic mice of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis* 8: 310-321.
- Warita H, Hayashi T, Murakami T, Manabe Y and Abe K (2001). Oxidative damage to mitochondrial DNA in spinal motoneurons of transgenic ALS mice. *Brain Res Mol Brain Res* 89: 147-152.
- Weydt P, Yuen EC, Ransom BR and Moller T (2004). Increased cytotoxic potential of microglia from ALS-transgenic mice. *Glia* 48: 179-182.
- Wils H, Kleinberger G, Janssens J, Pereson S, Joris G, Cuijt I, Smits V, Ceuterick-de Groote C, Van Broeckhoven C and Kumar-Singh S (2010). TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3858-3863.
- Winkler EA, Sengillo JD, Sagare AP, Zhao Z, Ma Q, Zuniga E, Wang Y, Zhong Z, Sullivan JS, Griffin JH, Cleveland DW and Zlokovic BV (2014). Blood-spinal cord barrier disruption contributes to early motor-neuron degeneration in ALS-model mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E1035-1042.
- Winkler EA, Sengillo JD, Sullivan JS, Henkel JS, Appel SH and Zlokovic BV (2013). Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 125: 111-120.
- Woodruff TM, Costantini KJ, Crane JW, Atkin JD, Monk PN, Taylor SM and Noakes PG (2008). The complement factor C5a contributes to pathology in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Immunol* 181: 8727-8734.
- Wu DC, Re DB, Nagai M, Ischiropoulos H and Przedborski S (2006). The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12132-12137.
- Xiao Q, Zhao W, Beers DR, Yen AA, Xie W, Henkel JS and Appel SH (2007). Mutant SOD1(G93A) microglia are more neurotoxic relative to wild-type microglia. *J Neurochem* 102: 2008-2019.
- Yamada K, Inoue D, Matsumoto S and Utsumi H (2004). In vivo measurement of redox status in streptozotocin-induced diabetic rat using targeted nitroxyl probes. *Antioxid Redox Signal* 6: 605-611.

- Yamada KI, Kuppusamy P, English S, Yoo J, Irie A, Subramanian S, Mitchell JB and Krishna MC (2002). Feasibility and assessment of non-invasive in vivo redox status using electron paramagnetic resonance imaging. *Acta Radiol* 43: 433-440.
- Yamaguchi T, Nakano T and Kimoto E (1984). Oxidation of nitroxide radicals by the reaction of hemoglobin with hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 120: 534-539.
- Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H and Cleveland DW (2008). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11: 251-253.
- Yamato M, Egashira T and Utsumi H (2003). Application of in vivo ESR spectroscopy to measurement of cerebrovascular ROS generation in stroke. *Free Radic Biol Med* 35: 1619-1631.
- Yokoyama H, Sato T, Ohya-Nishiguchi H and Kamada H (1998). In vivo 300 MHz longitudinally detected ESR-CT imaging in the head of a rat treated with a nitroxide radical. *MAGMA* 7: 63-68.
- Zanette G, Tamburin S, Manganotti P, Refatti N, Forgione A and Rizzuto N (2002). Different mechanisms contribute to motor cortex hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol* 113: 1688-1697.
- Zang DW, Yang Q, Wang HX, Egan G, Lopes EC and Cheema SS (2004). Magnetic resonance imaging reveals neuronal degeneration in the brainstem of the superoxide dismutase 1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 20: 1745-1751.
- Zhang R, Goldstein S and Samuni A (1999). Kinetics of superoxide-induced exchange among nitroxide antioxidants and their oxidized and reduced forms. *Free Radic Biol Med* 26: 1245-1252.
- Zhang X, Chen S, Song L, Tang Y, Shen Y, Jia L and Le W (2014). MTOR-independent, autophagic enhancer trehalose prolongs motor neuron survival and ameliorates the autophagic flux defect in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy* 10: 588-602.
- Zhang Y and Pardridge WM (2001). Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood-brain barrier. *J Neurochem* 76: 1597-1600.

- Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Zhang W, Urushitani M, Julien JP and Appel SH (2010). Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. *Glia* 58: 231-243.
- Zhelev Z, Bakalova R, Aoki I, Matsumoto K, Gadjeva V, Anzai K and Kanno I (2009). Nitroxyl radicals for labeling of conventional therapeutics and noninvasive magnetic resonance imaging of their permeability for blood-brain barrier: relationship between structure, blood clearance, and MRI signal dynamic in the brain. *Mol Pharm* 6: 504-512.
- Zhelev Z, Gadjeva V, Aoki I, Bakalova R and Saga T (2012). Cell-penetrating nitroxides as molecular sensors for imaging of cancer in vivo, based on tissue redox activity. *Mol Biosyst* 8: 2733-2740.
- Zhelev Z, Matsumoto K, Gadjeva V, Bakalova R, Aoki I, Zheleva A and Anzai K (2009). EPR signal reduction kinetic of several nitroxyl derivatives in blood in vitro and in vivo. *Gen Physiol Biophys* 28: 356-362.
- Zhong Z, Deane R, Ali Z, Parisi M, Shapovalov Y, O'Banion MK, Stojanovic K, Sagare A, Boillee S, Cleveland DW and Zlokovic BV (2008). ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nat Neurosci* 11: 420-422.
- Zlokovic BV (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57: 178-201.

Biografija

Stefan Stamenković je rođen 2. januara 1986. godine u Beogradu, gde je 2000. godine završio osnovnu školu „Vuk Karadžić“. Od 2000. do 2004. godine pohađao je Prvu beogradsku gimnaziju, prirodno-matematički smer. Godine 2004. upisao se na Osnovne akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Biologija, usmerenje Fiziologija životinja. Tokom osnovnih studija bio je stipendista Ministarstva nauke za školsku godinu 2006/07. i 2007/08, kao i stipendista grada Beograda za talentovane studente za 2007, 2008. i 2009. godinu. Godine 2009. je diplomirao sa prosečnom ocenom 9,93 kao student generacije Biološkog fakulteta. Godine 2010. upisuje Doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Nauronauke, modul Neurofiziologija sa biofizikom. Eksperimentalni deo doktorske disertacije radi u Centru za lasersku mikroskopiju, Instituta za fiziologiju i biohemiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Kao student doktorskih studija postaje stipendista Ministarstva nauke i prosvete na projektu „Biomarkeri u neurodegenerativnim i malignim procesima“ za školsku godinu 2010/11. i 2011/12. Od 2012. godine je preko istog projekta zaposlen kao istraživač-pripravnik, a potom 2013. godine izabran u zvanje istraživač-saradnik na Institutu za fiziologiju i biohemiju, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Učestvovao je na bilateralnim projektima sa Slovenijom, Italijom, Nemačkom i Hrvatskom. Koautor je pet radova kategorije M21, jednog rada kategorije M22, dva rada kategorija M23 i dva poglavlja u knjigama kategorije M14 i M42. Koautor je i 20 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampanih u izvodu (M34) i 5 saopštenja na nacionalnim naučnim skupovima štampanih u izvodu (M64). Radovi autora su do juna 2017. godine citirani 33 puta u časopisima sa JCR liste (bez autocitata).

Rezultati predstavljeni u doktorskoj disertaciji publikovani su u radovima:

- **Stamenković S**, Dučić T, Stamenković V, Kranz A, Andjuz PR. Imaging of glial cell morphology, sod1 distribution and elemental composition in the brainstem and hippocampus of the ALS hSOD1(G93A) rat. *Neuroscience*. 2017 May 30. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.05.041.

- **Stamenković S, Pavićević A, Mojović M, Popović-Bijelić A, Selaković V, Andjus P, Bačić G.** In vivo EPR pharmacokinetic evaluation of the redox status and the blood brain barrier permeability in the SOD1(G93A) ALS rat model. *Free Radic Biol Med.* 2017 Mar 31;108:258-269. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.034.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Стефан Стаменковић

број индекса Б3008/2010

Изјављујем

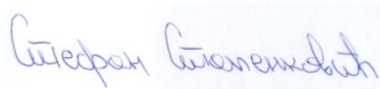
да је докторска дисертација под насловом

Испитивање раних маркера процеса неуроинфламације и оксидативног стреса у мозгу трансгеног hSOD1 G93A пацова као експерименталног модела амиотрофичне латералне склерозе.

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

Потпис докторанда

У Београду, 7.7.2017.



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Стефан Стаменковић

Број индекса Б3008/2010

Студијски програм Неуронауке

Наслов рада Испитивање раних маркера процеса неуроинфламације и
 оксидативног стреса у мозгу трансгеног hSOD1 G93A пацова као
 експерименталног модела амиотрофичне латералне склерозе.

Ментор Проф. Др Павле Р. Анђус

Потписани/а Стефан Стаменковић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 7.7.2017.

 Стефан Стаменковић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Испитивање раних маркера процеса неуроинфламације и оксидативног стреса у мозгу трансгеног hSOD1 G93A пацова као експерименталног модела амиотрофичне латералне склерозе.

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

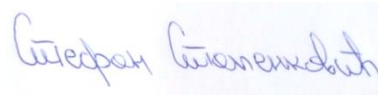
5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 7.7.2017.



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

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

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

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

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

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