

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Dušan R. Mladenović

**DEJSTVO FINASTERIDA NA
BIHEJVIORALNE,
ELEKTROENCEFALOGRAFSKE I
ĆELIJSKE PROMENE U HEPATIČNOJ
ENCEFALOPATIJI IZAZVANOJ
TIOACETAMIDOM KOD PACOVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Dušan R. Mladenović

**THE EFFECTS OF FINASTERIDE ON
BEHAVIORAL,
ELECTROENCEPHALOGRAPHIC AND
CELLULAR CHANGES IN
THIOACETAMIDE-INDUCED HEPATIC
ENCEPHALOPATHY IN RATS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2013

Mentor doktorske disertacije: Prof. dr TATJANA RADOSAVLJEVIĆ, redovni profesor na Institutu za patološku fiziologiju „Ljubodrag Buba Mihailović“, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Komentor doktorske disertacije: Prof. dr OLIVERA STANOJLOVIĆ, redovni profesor na Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

KOMISIJA ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE:

1. Prof. dr VLADIMIR TRAJKOVIĆ, predsednik, vanredni profesor na Institutu za imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr NATAŠA PETRONIJEVIĆ, redovni profesor na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr BRANKA ŠIKIĆ, redovni profesor u penziji, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Zahvaljujem se mentoru Prof. dr Tatjani Radosavljević i komentoru Prof. dr Oliveri Stanojlović na pomoći, sugestijama i podršci u izradi doktorske disertacije

**DEJSTVO FINASTERIDA NA BIHEJVIOALNE,
ELEKTROENCEFALOGRAFSKE I ČELIJSKE PROMENE U HEPATIČNOJ
ENCEFALOPATIJI IZAZVANOJ TIOACETAMIDOM KOD PACOVA**

Hepatična encefalopatija (HE) predstavlja neuropsihijatrijski sindrom, koji se razvija kao posledica akutne ili hronične insuficijencije jetre. Za ispitivanje patogeneze HE koriste se različiti eksperimentalni modeli, uključujući model izazvan portno-kavnim šantom, stenozom portne vene, modele izazvane hepatotoksičnim agensima (tioacetamid, D-galaktozamin, paracetamol, azoksimetan, ugljen-tetrahlorid) i modele ciroze jetre. U razvoju HE ključnu ulogu ima hiperamonijemija, a mehanizmi uključeni u patogenezu HE uključuju: citotoksični edem mozga, poremećaje neurotransmisije (pretežno glutamatergičke i GABA-ergičke), energetske poremećaje, oksidacijski stres, mitohondrijsku disfunkciju i neuroinflamaciju. U HE povećava se sinteza neurosteroida, koji pozitivnom alosternom modulacijom receptora za gama-aminobuternu kiselinu (GABA_A receptora) pojačavaju efekte GABA u centralnom nervnom sistemu. Finasterid, inhibitor 5 α -reduktaze i sinteze neurosteroida, potencijalno može menjati tok HE.

Ciljevi ove disertacije su bili: da se ispituju bihevioralne i elektroencefalografske (EEG) promene u HE izazvanoj tioacetamidom kod pacova; da se odrede parametri oksidacijskog stresa i antioksidacijske zaštite, aktivnost acetilholinesteraze (AChE) i ekspresiju ćelijskih markera u različitim moždanim regionima u intoksikaciji tioacetamidom; da se ispita uticaj finasterida na bihevioralne, EEG i ćelijske promene u HE izazvanoj tioacetamidom kod pacova.

U cilju ispitivanja efekata tioacetamida (TAA) na ponašanje, EEG i ćelijske promene mužjaci Wistar pacova su podeljeni u sledeće grupe: 1. kontrolna grupa (n=8); 2. eksperimentalna grupa tretirana TAA na dozno zavisani način: TAA₃₀₀ (300 mg/kg, n=8), TAA₆₀₀ (600 mg/kg, n=10) i TAA₉₀₀ (900 mg/kg, n=18). Dnevne doze TAA (300 mg/kg) su primenjene tokom jednog (TAA₃₀₀), dva (TAA₆₀₀) ili tri uzastopna dana (TAA₉₀₀). U cilju ispitivanja uticaja finasterida na HE izazvanu TAA-om, životinje su podeljene u sledeće grupe: 1. kontrolna grupa (n=8); 2. TAA₉₀₀ grupa tretirana TAA (900 mg/kg, n=18); 3. grupa tretirana finasteridom, FIN (150 mg/kg, n=8); 4. FIN+TAA₉₀₀ grupa

(n=10) tretirana finasteridom (150 mg/kg) i TAA (900 mg/kg). Dnevne doze TAA (300 mg/kg) i FIN (50 mg/kg) su administrirane tokom tri uzastopna dana, a u FIN+TAA₉₀₀ grupi FIN (50 mg/kg) je primenjen 2 h pre svake pojedinačne doze TAA (300 mg/kg). Sve supstance su primenjene intraperitonealno. U svim grupama bihevioralne karakteristike su praćene 0, 2, 4, 6 i 24 h nakon tretmana, dok je EEG registrovan u periodu 22-24 h nakon poslednje doze TAA i analiziran brzom Furijeovom transformacijom u vremenskim tačkama 22,5 h, 23 h i 23,5 h nakon tretmana. Parametri oksidacijskog stresa i aktivnost AchE su određeni u hipokampusu, moždanoj kori, talamusu, *nc. caudatusu* i moždanom stablu spektrofotometrijskom metodom 24 h nakon tretmana. Ekspresije NeuN kao markera neurona, MOG kao markera oligodendrocita, Iba 1 kao markera mikroglije i GFAP kao markera astrocita, kao i ekspresija subjediničnog NADPH oksidaze i izoenzima superoksid dizmutaze (SOD) u hipokampusu i moždanoj kori su određene Western blot metodom.

Vitalni refleksi (kornealni refleks, refleksi uklanja, hvatanja i uspravljanja) su bili značajno sniženi u TAA₆₀₀ grupi 24 h nakon primene druge doze TAA ($p < 0,05$) i u TAA₉₀₀ grupi 2 h nakon tretmana ($p < 0,01$) u poređenju sa kontrolom. Refleksni trzaji glave, auditivni refleks, ekvilibrijumski test i refleks postavljanja su bili značajno oslabljeni u TAA₆₀₀ grupi u poređenju sa kontrolom u svim vremenskim tačkama ($p < 0,01$), dok su ovi refleksi bili ugašeni kod svih životinja iz TAA₉₀₀ grupe 24 h nakon primene poslednje doze TAA. Opšta motorna aktivnost i eksplorativno ponašanje su bili značajno niži u TAA₆₀₀ grupi u poređenju sa kontrolom u svim vremenskim tačkama ($p < 0,01$). Sa porastom doze TAA je izazvao izraženiji pad motorne aktivnosti i eksplorativnog ponašanja i u TAA₉₀₀ grupi ovi testovi su bili značajno niži u odnosu na TAA₆₀₀ grupu ($p < 0,01$).

Srednja ukupna spektralna snaga je bila značajno viša u TAA₃₀₀ ($p < 0,01$) i TAA₆₀₀ grupi 23,5 h nakon tretmana ($p < 0,01$) i značajno niža u TAA₉₀₀ grupi ($p < 0,01$) u svim vremenskim tačkama u poređenju sa kontrolom. Srednja spektralna snaga beta i alfa talasa je bila značajno viša u TAA₃₀₀ grupi u poređenju sa kontrolom, dok je u TAA₆₀₀ grupi uočen značajan porast srednje snage beta talasa 23 h, a alfa i teta 23,5 h nakon tretmana u odnosu na kontrolu. Dok je srednja spektralna snaga delta talasa bila značajno viša u TAA₆₀₀ grupi ($p < 0,01$), srednja snaga ovih talasa je bila značajno niža u TAA₉₀₀ grupi ($p < 0,01$) u poređenju sa kontrolom. Relativna spektralna snaga beta i delta talasa je bila

značajno niža, a alfa talasa značajno viša u TAA₃₀₀ grupi u odnosu na kontrolu. Dok je u TAA₆₀₀ grupi uočen značajan pad zastupljenosti delta talasa i porast zastupljenosti teta talasa 22,5 h nakon tretmana, u TAA₉₀₀ grupi zastupljenost delta talasa je bila značajno viša, a teta talasa značajno niža u odnosu na kontrolu u svim vremenskim tačkama.

Nivo malondialdehida (MDA) u moždanom korteksu je bio značajno viši u TAA₆₀₀ ($p < 0,05$) i TAA₉₀₀ grupi ($p < 0,01$), a u moždanom stablu u svim grupama tretiranim TAA-om u poređenju sa kontrolom. U hipokampusu nivo MDA je bio značajno niži u TAA₃₀₀ ($p < 0,01$), a značajno viši u TAA₉₀₀ grupi ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolu. Aktivnost katalaze u korteksu je bila značajno viša u TAA₃₀₀ ($p < 0,01$) i značajno niža u TAA₆₀₀ ($p < 0,01$) i TAA₉₀₀ grupi ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolu. Dok je TAA izazvao smanjenje aktivnosti katalaze u moždanom stablu u TAA₆₀₀ i TAA₉₀₀ grupi, aktivnost ovog enzima u hipokampusu je bila značajno viša u TAA₃₀₀ ($p < 0,01$) i TAA₆₀₀ grupi ($p < 0,01$) u poređenju sa kontrolom. Slično kao u korteksu i moždanom stablu, aktivnost katalaze u hipokampusu je bila značajno niža u TAA₉₀₀ u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,01$).

Pretretman FIN-om je sprečio slabljenje vitalnih refleksa kod svih životinja iz FIN+TAA₉₀₀ grupe. Učestalost očuvanih refleksnih trzaja glave, auditivnog refleksa, ekvilibrijumskog testa i refleksa postavljanja, kao i motorna aktivnost i eksplorativno ponašanje su bili značajno viši u FIN+TAA₉₀₀ u odnosu na TAA₉₀₀ grupu. Takođe, srednja ukupna spektralna snaga EEG talasa je bila značajno viša u FIN+TAA₉₀₀ u odnosu na TAA₉₀₀ grupu ($p < 0,01$). Pretretman FIN-om je izazvao značajan porast srednje spektralne snage beta, alfa i delta talasa u odnosu na kontrolu. Zastupljenost beta, alfa i teta talasa je bila značajno viša, a delta talasa značajno niža u FIN+TAA₉₀₀ grupi u poređenju sa kontrolom i TAA₉₀₀ grupom.

Pretretman FIN-om je smanjio lipidnu peroksidaciju u korteksu u odnosu na TAA₉₀₀ grupu, dok se nivo MDA nije značajno razlikovao u hipokampusu i *nc. caudatusu* životinja iz FIN+TAA₉₀₀ i TAA₉₀₀ grupe. U talamusu nivo MDA bio značajno viši u FIN+TAA₉₀₀ u odnosu na TAA₉₀₀ grupu ($p < 0,01$). Pretretman FIN-om je sprečio pad ekspresije p22 i p67 subjedinice NADPH oksidaze u hipokampusu izazvan TAA-om, izazvao porast aktivnosti SOD1 i pad glutation reduktaze (GR). U korteksu nivo redukovanog glutationa (GSH) i aktivnost katalaze su bili značajno viši u FIN+TAA₉₀₀ u odnosu na kontrolnu grupu. Nivo

GSH u *nc. caudatusu* je bio značajno niži u FIN+TAA₉₀₀ u odnosu na kontrolnu i TAA₉₀₀ grupu ($p < 0,01$), dok je aktivnost SOD bila viša u FIN+TAA₉₀₀ u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$). U talamusu pretretman FIN-om sprečava porast aktivnosti glutathion peroksidaze (GPx) izazvan TAA-om, smanjuje aktivnost GR i katalaze. Aktivnost AchE u talamusu i *nc. caudatusu* je bila značajno viša u TAA₉₀₀ grupi u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$), dok se u FIN+TAA₉₀₀ grupi nije razlikovala u odnosu na kontrolu. Ekspresija NeuN u hipokampusu je bila značajno niža u TAA₉₀₀ grupi ($p < 0,05$), dok je ekspresija Iba1 bila značajno viša u TAA₉₀₀, FIN i FIN+TAA₉₀₀ grupi u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$). Ekspresija GFAP u hipokampusu je bila značajno viša u TAA₉₀₀ ($p < 0,05$) i značajno niža u FIN+TAA₉₀₀ grupi ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu.

Bihevioralne i EEG promene ukazuju da tioacetamid izaziva HE kod pacova na dozno-zavistan način. Tioacetamid u dozi od 600 mg/kg se može koristiti za ispitivanje patogenetskih mehanizama motornih promena u HE, a u dozi od 900 mg/kg za ispitivanje patogeneze hepatične kome. Tioacetamid izaziva lipidnu peroksidaciju u mozgu na dozno-zavistan način, pri čemu je moždano stablo najosetljivije, a talamus i hipokampus najmanje osetljivi na dejstvo slobodnih radikala. Patogenezi hepatične kome u intoksikaciji tioacetamidom potencijalno doprinosi indukcija AchE u talamusu i *nc. caudatusu*.

Pretretman finasteridom poboljšava motorne sposobnosti i EEG promene i sprečava nastanak najtežih formi HE izazvane tioacetamidom kod pacova, uključujući hepatičnu komu. Jedan od potencijalnih mehanizama povoljnog dejstva finasterida na tok HE izazvane tioacetamidom je inhibicija AchE u talamusu i *nc. caudatusu* i modulacija holinergičke transmisije. Iako finasterid menja aktivnost antioksidacijskih enzima, smanjenje oksidacijskog stresa najverovatnije ne doprinosi značajno neuroprotektivnim efektima finasterida u HE. Bihevioralne i EEG promene ukazuju da se finasterid može koristiti kao potencijalno neuroprotektivno sredstvo u terapiji HE, ali njegova klinička upotreba zahteva prethodna istraživanja o štetnim efektima ove terapije.

Ključne reči: hepatična encefalopatija, tioacetamid, bihevioralne promene, elektroencefalografija, oksidacijski stres, acetilholinesteraza, finasterid, pacovi

Naučna oblast: Molekularna medicina

THE EFFECTS OF FINASTERIDE ON BEHAVIORAL, ELECTROENCEPHALOGRAPHIC AND CELLULAR CHANGES IN THIOACETAMIDE-INDUCED HEPATIC ENCEPHALOPATHY IN RATS

Hepatic encephalopathy (HE) represents a neuropsychiatric syndrome, that appears as a consequence of acute or chronic liver failure. Various experimental models are used for the investigation of the pathogenesis of HE, including porto-caval shunt, portal vein stricture, models induced by hepatotoxic agents (thioacetamide, D-galactosamine, acetaminophen, azoxymethane, carbon tetrachloride) and models of liver cirrhosis. Hyperammonemia has a pivotal role in the development of HE, and mechanisms involved in the pathogenesis of HE include: cytotoxic brain edema, alterations in neurotransmission (especially glutamatergic and GABAergic), energy disturbances, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation. The synthesis of neurosteroids is increased in HE and by positive allosteric modulation of gamma-aminobutyric acid (GABA_A) receptors they potentiate the effects of GABA in the central nervous system. Finasteride, 5 α -reductase and neurosteroid synthesis inhibitor, may potentially modulate the course of HE.

The aims of this dissertation were: to investigate the behavioral and electroencephalographic (EEG) changes in thioacetamide-induced HE in rats; to determine the parameters of oxidative stress and antioxidative protection, the activity of acetylcholinesterase (AChE) and cellular marker expression in various brain regions; to investigate the effects of finasteride on behavioral, EEG and cellular changes in thioacetamide-induced HE in rats.

In order to investigate the effects of thioacetamide (TAA) on the behavior, EEG and cellular changes male Wistar rats were divided into the following groups: 1. control; 2. experimental group treated with TAA in a dose-dependent manner: TAA₃₀₀ (300 mg/kg; n=8), TAA₆₀₀ (600 mg/kg; n=10) and TAA₉₀₀ (900 mg/kg; n=18). Daily doses of TAA (300 mg/kg) were administered once (TAA₃₀₀), twice (TAA₆₀₀) or three times (TAA₉₀₀) in subsequent days. In order to investigate the effects of finasteride on TAA-induced HE, the animals were divided into the following groups: 1. control (n=8); 2. TAA₉₀₀ group treated

with TAA (900 mg/kg; n=18); 3. FIN group treated with finasteride (150 mg/kg; n=8); 4. FIN+TAA₉₀₀ group (n=10) treated with FIN (150 mg/kg) and TAA (900 mg/kg). The daily doses of FIN (50 mg/kg) and TAA (300 mg/kg) were administered in three subsequent days, and in FIN+TAA₉₀₀ group FIN (50 mg/kg) was administered 2 h before each dose of TAA (300 mg/kg). All substances were administered intraperitoneally. In all groups behavioral changes were observed 0, 2, 4, 6 and 24 h after the treatment, while EEG was registered 22-24 h after last dose of TAA and analyzed by fast Fourier transformation at time points 22.5 h, 23 h and 23.5 h after the treatment. Oxidative stress parameters and AchE activity were determined in the hippocampus, cerebral cortex, thalamus, caudate nucleus and brainstem spectrophotometrically 24 h after the treatment. The expressions of neuronal marker NeuN, oligodendrocyte marker MOG, microglial marker Iba1 and astrocytic marker GFAP, as well as the expression of NADPH oxidase subunits and superoxide dismutase (SOD) isoenzymes in the hippocampus and cerebral cortex were determined by Western blot analysis.

Vital reflexes (corneal, withdrawal, grasping and righting reflex) were significantly diminished in TAA₆₀₀ group 24 h after the administration of the second dose of TAA ($p < 0,05$) and in TAA₉₀₀ group 2 h after the treatment ($p < 0,01$) by comparison with control. Head shake, auditory startle reflex, equilibrium and placement test were significantly lower in TAA₆₀₀ vs. control group at all time points ($p < 0.01$), while these reflexes were absent in all animals from TAA₉₀₀ group 24 h after the administration of the last dose of TAA. general motor activity and exploratory behavior were significantly lower in TAA₆₀₀ vs. control group at all time points ($p < 0.01$). With increasing dose TAA caused a more prominent decline in motor activity and exploratory behavior and in TAA₉₀₀ group these tests were significantly lower when compared with TAA₆₀₀ group ($p < 0.01$).

Mean total power density was significantly higher in TAA₃₀₀ ($p < 0.01$) and TAA₆₀₀ group 23.5 h after the treatment ($p < 0.01$) and significantly lower in TAA₉₀₀ group ($p < 0.01$) vs. control at all time points. Mean power densities in beta and alpha band were significantly higher in TAA₃₀₀ vs. control group, while in TAA₆₀₀ group a significant increase in mean beta power was evident 23 h, and in mean alpha and theta power 23.5 h after the treatment when compared with control group. While the mean power density in

delta band was significantly higher in TAA₆₀₀ group ($p < 0.01$), the mean delta density was significantly lower in TAA₉₀₀ ($p < 0.01$) vs. control group. The relative power density in beta and delta band was significantly lower and in alpha band significantly higher in TAA₃₀₀ group vs. control. While a significant decline in relative delta power and a significant increase in relative theta power were evident in TAA₆₀₀ group 22.5 h after the treatment, in TAA₉₀₀ group the relative delta power was increased and the relative theta power was decreased at all time points when compared with control group.

Malondialdehyde (MDA) level in the cerebral cortex was significantly higher in TAA₆₀₀ ($p < 0.05$) and TAA₉₀₀ group ($p < 0.01$), while in the brainstem MDA level was significantly higher in all TAA-treated groups vs. control. Hippocampal MDA level was significantly lower in TAA₃₀₀ ($p < 0.01$) and significantly higher in TAA₉₀₀ ($p < 0.01$) vs. control group. Cortical catalase activity was significantly higher in TAA₃₀₀ ($p < 0.01$) and significantly lower in TAA₆₀₀ ($p < 0.01$) and TAA₉₀₀ groups ($p < 0.01$) vs. control. While TAA caused a decline in brainstem catalase activity in TAA₆₀₀ and TAA₉₀₀ group, the activity of this enzyme in the hippocampus was significantly higher in TAA₃₀₀ ($p < 0.01$) and TAA₆₀₀ group ($p < 0.01$) vs. control. Similar to the cortex and brainstem, hippocampal catalase activity was significantly lower in TAA₉₀₀ group vs. control ($p < 0.01$).

FIN pretreatment prevented a decline in vital reflexes in all animals from FIN+TAA₉₀₀ group. Head shake, auditory startle reflex, equilibrium and placement test, as well as general motor activity and exploratory behavior were significantly higher in FIN+TAA₉₀₀ by comparison with TAA₉₀₀ group. Additionally, mean total power density was significantly higher in FIN+TAA₉₀₀ vs. TAA₉₀₀ group ($p < 0.01$). FIN pretreatment induced a significant increase in mean power in beta, alpha and delta bands when compared with control. The relative power in beta, alpha and theta band was significantly higher, while the relative power in delta band was significantly lower in FIN+TAA₉₀₀ by comparison with control and TAA₉₀₀ group.

FIN pretreatment decreased lipid peroxidation in the cortex vs. TAA₉₀₀ group, while no difference in MDA level in the hippocampus and caudate nucleus was evident between FIN+TAA₉₀₀ and TAA₉₀₀ group. MDA level in the thalamus was significantly higher in FIN+TAA₉₀₀ vs. TAA₉₀₀ group ($p < 0.01$). FIN pretreatment prevented a TAA-induced

decline in the expression of p22 and p67 subunits of NADPH oxidase, caused an increase in SOD1 activity and a decrease in glutathione reductase (GR) activity. In the cortex reduced glutathione (GSH) level and catalase activity were significantly higher in FIN+TAA₉₀₀ when compared with control group. GSH level in caudate nucleus was significantly lower in FIN+TAA₉₀₀ vs. control and TAA₉₀₀ group ($p<0.01$), while SOD activity was higher in FIN+TAA₉₀₀ by comparison with control group ($p<0.05$). FIN pretreatment prevented a TAA-induced increase in glutathione peroxidase (GPx) activity in the thalamus and decreased GR and catalase activity. AchE activity in the thalamus and caudate nucleus was significantly higher in TAA₉₀₀ vs. control group ($p<0.05$), while in FIN+TAA₉₀₀ group the activity of this enzyme was not different when compared with control. Hippocampal NeuN expression was significantly lower in TAA₉₀₀ group ($p<0.05$), while Iba1 expression was significantly higher in TAA₉₀₀, FIN and FIN+TAA₉₀₀ groups vs. control ($p<0.05$). Hippocampal GFAP expression was significantly higher in TAA₉₀₀ ($p<0.05$) and significantly lower in FIN+TAA₉₀₀ ($p<0.05$) vs. control.

Behavioral and EEG changes indicate that TAA induces HE in a dose-dependent manner. TAA in a dose of 600 mg/kg may be used for the investigation of the pathogenesis of motor manifestations in HE, and in a dose of 900 mg/kg for the investigation of the pathogenesis of hepatic coma. TAA induces lipid peroxidation in the brain in a dose-dependent manner, with the brainstem being the most sensitive, and the thalamus and the hippocampus the least sensitive to the effects of reactive oxygen species. AchE induction in the thalamus and caudate nucleus may contribute to the pathogenesis of TAA-induced HE.

FIN pretreatment improves motor performance and EEG changes and prevents the development of most severe forms of TAA-induced HE, including hepatic coma. One of potential mechanisms of beneficial effects of finasteride in HE may be inhibition of AchE and modulation of cholinergic transmission. Although FIN changed the antioxidative enzyme activity, alleviation of oxidative stress does not contribute to the neuroprotective effects of FIN in HE. Behavioral and EEG changes indicate that finasteride may be used as a potential neuroprotective device in the therapy of HE, but its side effects should be further investigated before clinical use.

Key words: hepatic encephalopathy, thioacetamide, behavioral changes, electroencephalography, oxidative stress, acetylcholinesterase, finasteride, rats

Research area: Molecular medicine

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Definicija i podela hepatične encefalopatije (HE)..... | 2 |
| 1.2. Dijagnoza HE | 3 |
| 1.3. Patogeneza HE..... | 6 |
| 1.3.1. <i>Poremećaji neurotransmisije u HE</i> | 9 |
| 1.3.2. <i>Oksidacijski stres, mitohondrijska disfunkcija i inflamacija u HE</i> | 15 |
| 1.3.3. <i>Uloga neuroinflamacije u patogenezi HE</i> | 17 |
| 1.3.4. <i>Uloga aminokiselina u patogenezi HE</i> | 18 |
| 1.4. Eksperimentalni modeli HE..... | 19 |
| 1.5. Efekti finasterida na neurotransmisiju..... | 22 |
| 2. CILJEVI | 24 |
| 3. MATERIJAL I METODE | 26 |
| 3.1. Korišćene supstance | 27 |
| 3.2. Eksperimentalne životinje | 27 |
| 3.2.1. <i>Uticaj TAA na ponašanje, EEG i parametre oksidacijskog stresa u mozgu</i> | 27 |
| 3.2.2. <i>Uticaj finasterida na bihevioralne, EEG i ćelijske promene u HE izazvanoj TAA-om</i> | 28 |
| 3.3. Bihevioralni testovi | 29 |
| 3.4. Analiza EEG-a..... | 31 |
| 3.5. Parametri oksidacijskog stresa i aktivnost acetilholinesteraze | 32 |
| 3.6. <i>Western blot</i> analiza | 34 |
| 3.7. Statistička analiza | 35 |
| 4. REZULTATI..... | 36 |
| 4.1. Uticaj TAA na ponašanje, EEG i parametre oksidacijskog stresa u mozgu..... | 37 |
| 4.1.1. <i>Histološka analiza</i> | 37 |
| 4.1.2. <i>Bihevioralni testovi</i> | 40 |
| 4.1.3. <i>Analiza EEG-a</i> | 45 |
| 4.1.4. <i>Uticaj TAA na oksidacijski stres</i> | 53 |

| | |
|--|-----|
| 4.2. Uticaj finasterida na bihevioralne, EEG i ćelijske promene u HE izazvanoj TAA..... | 58 |
| 4.2.1. <i>Bihevioralni testovi</i> | 61 |
| 4.2.2. <i>Analiza EEG-a</i> | 66 |
| 4.2.3. <i>Uticaj finasterida na oksidacijski stres u mozgu izazvan TAA-om</i> | 73 |
| 4.2.4. <i>Uticaj finasterida i TAA na aktivnost acetilholinesteraze</i> | 83 |
| 4.2.5. <i>Ćelijski markeri u mozgu</i> | 83 |
| 5. DISKUSIJA..... | 86 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 109 |
| 7. LITERATURA..... | 112 |

1.UVOD

1.1. Definicija i podela hepatične encefalopatije (HE)

Hepatična encefalopatija (HE) predstavlja neuropsihijatrijski sindrom koji se javlja kod pacijenata sa akutnom ili hroničnom insuficijencijom jetre (1,2). Spektar kliničkih manifestacija u HE obuhvata: neuromišićne poremećaje, poremećaje senzibiliteta, emocionalne poremećaje, promene ličnosti i svesti (loša koncentracija, konfuzija, oštećeno pamćenje i produženo vreme reagovanja na spoljašnje draži), koje su praćene promenama u EEG-u (3). Od motornih poremećaja najčešće se javljaju rigidnost, hiperrefleksija i asteriksis (lepršavi tremor koji nastaje zbog oscilirajućih promena u aktivnosti neuronskih mreža, a najčešće se ispoljava na ekstremitetima i jeziku) (4,5). Asteriksis se može ustanoviti pri ispruženim rukama pacijenta sa dorzifleksijom šaka, a u slučaju nemogućnosti podizanja ruku, može se uočiti na osnovu ritmičnih promena snage stiska šake (4). Ponekad klinička slika podseća na parkinsonizam (5), dok su fokalni neurološki ispadi u HE retki. U svom najtežem obliku, HE može izazvati sopor i hepatičnu komu sa potencijalnim letalnim ishodom (3).

Radna grupa za HE je predložila klasifikaciju HE na osnovu kliničkih ispoljavanja i etiologije. Na osnovu ove klasifikacije HE se deli na: tip A (encefalopatija udružena sa akutnom insuficijencijom jetre), tip B (encefalopatija udružena sa portno-sistemskim šantom bez oboljenja jetre) i tip C (encefalopatija udružena sa cirozom jetre). Tip C encefalopatije se dalje može ispoljiti u tri oblika: minimalna, epizodična i manifestna HE (3,4,6). Minimalna HE se karakteriše kognitivnim poremećajima koji nisu uočljivi standardnim neurološkim pregledom niti neuropsihološkim ili neurofiziološkim testovima (3,7). Najčešće promene u minimalnoj HE podrazumevaju suptilne poremećaje pažnje i finih motornih veština, kao i usporenu obradu informacija bez jasno uočljivih poremećaja pamćenja, jezičkog izražavanja i prostorne percepcije (8). Epizodična HE se karakteriše akutnim povremenim promenama mentalnog stanja, koje se mogu razviti spontano ili biti izazvane nekim provocirajućim činiocem. Najčešći provocirajući činioci za pogoršanje epizodične HE su: gastrointestinalno krvarenje, konstipacija, prekomeran unos proteina hranom, infekcije, bubrežna insuficijencija, dehidracija i elektrolitni poremećaji (npr. hiponatrijemija) (7). Spontana pogoršanja epizodične HE (bez jasnih provocirajućih činilaca) se viđaju najčešće kod pacijenata sa velikim portno-sistemskim šantovima

(nastalim spontano, hirurškim putem ili usled transjugularnih intrahepatičnih portno-sistemskih šantova). Perzistentna HE se karakteriše hroničnim kognitivnim i motornim poremećajima koji se odražavaju na socijalne i profesionalne aktivnosti pacijenta i u najtežem obliku izazivaju zavisnost od tuđe nege (7).

1.2. Dijagnoza HE

Dijagnoza HE se zasniva na anamnestičkim podacima, kliničkoj slici, elektrofiziološkim, neuropsihološkim i neurofiziološkim ispitivanjima. Za uspešnu terapiju HE neophodna je precizna klasifikacija neuroloških i psihijatrijskih manifestacija kao prvi korak u dijagnostici. Standardizacija skala za evaluaciju neuroloških promena u HE je tek u razvoju, a najčešće se u praksi koristi West Haven skala (4,7), koja HE deli u četiri stadijuma na osnovu promena svesti, intelektualnih funkcija, ponašanja i neuroloških nalaza (Tabela 1.1). Ova skala je subjektivna, što je uslovalo uvođenje brojnih modifikacija.

Tabela 1.1. West Haven kriterijumi za klasifikaciju HE na osnovu težine kliničke slike (preuzeto iz Bajaj, 2010)

| Stadijum HE | Stanje svesti | Ponašanje, intelektualne funkcije | Neurološki nalazi |
|-------------|-------------------------|--|--|
| 0 | Normalno | Normalno | Normalni (minimalna HE, ako su izmenjeni psihomotorni testovi) |
| 1 | Blagi poremećaji svesti | Oslabljena pažnja, otežano obavljanje matematičkih operacija | Blagi asteriksis |
| 2 | Letargija | Dezorijentacija, neprimereno ponašanje | Izraženi asteriksis, poremećaji govora |
| 3 | Somnolencija | Izražena dezorijentacija sa bizarnim ponašanjem | Mišićna rigidnost i klonus, hiperrefleksija |
| 4 | Koma | Koma | Decerebracioni položaj |

Jedna od skala kojom je objektivizirana klasifikacija HE jeste Algoritam za stepenovanje hepatične encefalopatije (engl. Hepatic Encephalopathy Scaling Algorithm, HESA), koji koristi kliničke pokazatelje i rezultate neuropsiholoških testova za definisanje stadijuma HE (9). U praksi se koristi veći broj neuropsiholoških testova za evaluaciju HE (Tabela 1.2).

Tabela 1.2. Neuropsihološki testovi za dijagnozu kognitivnih poremećaja kod pacijenata sa cirozom jetre (modifikovano prema Córdoba, 2011)

| Neuropsihološki test | Karakteristike testa | Validnost |
|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| RBANS | Kratka baterija | Veliki normativi Dostupan na brojnim jezicima Malo podataka o validnosti u cirozi Uglavnom testiran na pacijentima sa Alchajmerovom bolešću |
| PHES | Kratka baterija | Nekoliko studija o njegovoj primeni u cirozi |
| CDR | Kompjuterizovani neuropsihološki test | Veliki normativi Malo podataka o primenljivosti u cirozi |
| Kritična frekvencija treptanja | Psihofizički test | Nezavisan od uzrasta i obrazovanja Meri stepen budnosti Identifikuje pacijente sa izmenjenim PHES |
| Inhibitorni kontrolni test | Kompjuterizovani neuropsihološki test | Veoma zahtevan test Zahteva standardizaciju za svaku populaciju U SAD dokazana njegova upotrebljivost za ispitivanje HE u cirozi |

RBANS (engl. Repeatable Battery for the Assessment of Neuropsychological Status), Reproducibilna baterija za procenu neuropsihološkog statusa

PHES (engl. Psychometric Hepatic Encephalopathy Score), Psihometrijska ocena hepatične encefalopatije

CDR (engl. Cognitive Drug Research), Kognitivno istraživanje lekova

Test sindroma portno-sistemske encefalopatije (test PSE sindroma) prati šest psiholoških parametara, koji se ocenjuju poređenjem pacijentovih parametara sa prosečnim rezultatima u zdravoj populaciji istog uzrasta i sličnog obrazovnog profila (4,10). Tako ocena 0 se dobija ukoliko je pacijentov parametar u intervalu od ± 1 sd od prosečnog; ocena -1: u intervalu od 1 do 2 sd ispod prosečnog; ocena -2: u intervalu od 2 do 3 sd ispod prosečnog; ocena -3: više od 3 sd ispod prosečnog. Analogno, ocene od +1 do +3 se daju ukoliko su parametri ispitanika bolji od prosečnih, tako da se ukupna ocena na svim testovima može kretati od +6 do -18. Ukupna ocena -4 predstavlja graničnu vrednost, koja sa senzitivnošću od 96% i specifičnošću od 100% ukazuje na HE (4). Ukoliko nije moguće izvođenje svih testova, dijagnoza HE se može postaviti i na osnovu dva testa, ukoliko su rezultati oba testa ispod nivoa od 2 sd u odnosu na prosečne rezultate u zdravoj populaciji (3).

Osim testa PSE sindroma, u praksi se za evaluaciju HE može koristiti i Reproducibilna baterija za procenu neuropsihološkog statusa (*engl.* Repeatability Battery for the Assessment of Neuropsychological Status, RBANS), koja podrazumeva grupu testova za ispitivanje kortikalnih i subkortikalnih funkcija (4,11). U HE dominantno su oštećene subkortikalne funkcije (11), ali upotrebljivost ovih testova u praćenju HE treba da bude predmet daljih istraživanja, s obzirom da su ovi testovi najčešće korišćeni u proceni kognitivnih poremećaja u Alchajmerovoj bolesti, shizofreniji i traumatskim ozledama mozga (4). Test PSE sindroma i RBANS zahtevaju učešće psihologa za pravilno izvođenje (4).

Test koji ne zahteva prisustvo psihologa, a koji pruža važne informacije o kognitivnim funkcijama u HE je kritična frekvencija treptanja (12). Ovaj test se zasniva na određivanju minimalne frekvencije treptanja svetlosnog izvora, pri kojoj pacijent gubi percepciju treptanja i doživljava svetlost kao kontinuiranu. Početna frekvencija treptanja svetlosti je 25 Hz, a potom se frekvencija povećava do trenutka gubitka percepcije treptanja. Isti test može započeti i primenom visokih frekvencija treptanja (oko 60 Hz), a potom se frekvencija smanjuje do trenutka kad pacijent uočava treptanje. Kritična frekvencija treptanja se kod zdravih osoba kreće oko 38-39 Hz, a u HE ta frekvencija je

snižena. Ovaj test je pogodan za utvrđivanje manifestne, ali nije dovoljno senzitivna za dijagnozu minimalne HE (4).

Inhibitorni kontrolni test je kompjuterizovani neuropsihološki test, kojim se ispituje tenacitet pažnje (13). Pacijentu se na ekranu prikazuju slova (stimulusi) i on treba da uoči naizmeničnu pojavu slova X i Y (mete). Između njih se umeću različita slična slova (mamci), koja mogu izazvati neprimerenu reakciju ispitanika. Test ukupno sadrži 1728 stimulusa, 40 mamaca i 212 slova meta, koji se ispitaniku prezentuju unutar 13 min od prvobitnog treninga (4,14). Smanjen broj uočenih meta i povećan broj reakcija na mamce ukazuje na HE i posebna pogodnost ovog testa je što je senzitivna za detekciju minimalne HE (14).

Elektroencefalografija (EEG) predstavlja korisnu metodu, kako za praćenje toka tako i za određivanje efikasnosti terapijskih procedura u HE (15). Različite elektrofiziološke analize su rađene u prethodnim studijama HE, uključujući vizuelnu analizu EEG-a (16,17), spektralnu analizu (16–18), merenje evociranih potencijala (15,19,20), kao i upotrebu veštačkih neuronskih mreža (21). Utvrđeno je da spektralna analiza EEG-a pruža pouzdanije informacije od vizuelne analize, s obzirom da omogućava bolju reproducibilnost i objektivnije tumačenje rezultata. Iako su veštačke neuronske mreže pokazale obećavajuće rezultate, spektralna analiza ipak ostaje pouzdan metod za analizu EEG-a u HE (21). Produžena latenca auditivnih evociranih potencijala može pomoći u dijagnozi HE (22), dok vizuelni i somatosenzorni evocirani potencijali imaju manju dijagnostičku vrednost (23,24).

1.3. Patogeneza HE

Patogeneza HE još uvek nije u potpunosti rasvetljena. Poznato je da HE nastaje usled sinergističkog dejstva akumuliranih toksina u organizmu (amonijak, mangan, kratkolančane masne kiseline, razgranate aminokiseline, merkaptani, lipopolisaharid i dr.), pri čemu ključnu ulogu u razvoju HE ima hiperamonijemija. Amonijak lako prolazi krvno-moždanu barijeru i u mozgu uzrokuje brojne poremećaje metabolizma, neurotransmisije i dr. (25).

Patogeneza HE u akutnoj i hroničnoj insuficijenciji jetre se delimično razlikuju. U akutnoj HE/hiperamoniemiji dominantna morfološka promena je citotoksični edem mozga nastao usled bubrenja astrocita. Edem mozga povećava intrakranijalni pritisak i može uzrokovati hernijaciju mozga sa potencijalnim smrtnim ishodom (26). Ranije se razvoj edema mozga u akutnoj HE/hiperamoniemiji objašnjavao osmotskim efektom glutamina. Prema ovoj teoriji, amonijak se u astrocitima prevodi u glutamin u reakciji amidacije glutamata pomoću glutamin sintetaze. Akumulacija glutamina uzrokuje povećanje osmolarnosti intracelularne tečnosti, što dovodi do povlačenja vode iz ekstracelularnog prostora i bubrenja astrocita (25,26). Međutim, kako glutamin čini manji deo osmotski aktivnih čestica u astrocitima (27) i kako se bubrenje javlja tek po vraćanju nivoa glutamina na fiziološke vrednosti (28), ova teorija je osporena. Prema savremenoj teoriji glutamin samo prenosi amonijak kroz citoplazmu do mitohondrija astrocita, gde se pod dejstvom glutaminaze aktivirane fosfatima ponovo oslobađa amonijak (hipoteza „Trojanskog konja“) (29). Amonijak izaziva mitohondrijsku disfunkciju sa povećanim stvaranjem slobodnih radikala, smanjenim stvaranjem adenozin-trifosfata (ATP) i smanjenjem aktivnosti Na^+/K^+ ATP-aze (30). Nakupljanje Na^+ u astrocitima uzrokuje nagomilavanje vode i bubrenje astrocita, a navodi se i povećana ekspresija akvaporina-4 kao mogući mehanizam njihovog bubrenja (31). Osim ovoga amonijak stimuliše i aktivaciju protein kinaza aktiviranih mitogenima (MAP kinaza), nuklearnog faktora kapa B (NF- κ B) i p53 proteina koji doprinose bubrenju astrocita (32,33). Disfunkcija endotelних ćelija izazvana amonijakom, citokinima, lipopolisaharidom takođe može dopinosti edemu mozga posredstvom slobodnih radikala i NF- κ B, slično kao i u astrocitima (34).

Iako je edem mozga u akutnoj HE dominantno posledica bubrenja astrocita, edemu mozga doprinosi i povećanje propustljivosti krvno-moždane barijere (vazogena komponenta). Prethodna istraživanja ukazuju da hiperamoniemija uzrokuje aktivaciju matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9), koja proteolizom aktivira receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR). EGFR preko p38 MAP kinaznog puta i NF- κ B smanjuje sintezu i ekspresiju okcludina, proteina tesnih veza, u endotelnim ćelijama, čime se narušava integritet krvno-moždane barijere (35–37).

Osim edema mozga, akutnu HE/hiperamonijemiju karakteriše i smrt neurona mehanizmom ekscitotoksičnosti usled povećanja glutamatergičke transmisije (38), kao i povećana ekspresija glukoznog transportera GLUT-1 u endotelnim ćelijama krvnih sudova u mozgu (39).

Za razliku od akutne HE, u hroničnoj HE/hiperamonijemiji edem mozga nije izražen, već je dominantna morfolološka promena Alchajmer (Alzheimer) tip II astrocitoza (40). Astrociti sa Alchajmer tip II fenotipom se mogu uočiti i u sivoj i u beloj masi mozga i njihov broj koreliše sa stepenom HE. Alchajmer tip II astrociti se karakterišu prominentnim jedarcima i krupnim svetlim jedrima, koja se mogu videti u paru i čiji oblik može da varira od okruglog u korteksu do nepravilnog u bazalnim ganglijama (41). Ove morfološke promene praćene su i promenama ekspresije gena za proteine koji regulišu volumen i energetske stanje astrocita i neurotransmisiju (42). Patogenetski mehanizmi koji su uključeni u razvoj hronične HE uključuju: poremećaje neurotransmisije sa prevagom inhibicijske neurotransmisije (38), oksidativni/nitrozativni stres (43), mitohondrijsku disfunkciju, energetske poremećaje (44), neuroinflamaciju (45) i promene aktivnosti Na^+/K^+ ATPaze (46).

Prvobitne teorije su naglašavale ulogu energetskih poremećaja u hiperamonijemiji kao ključnih činilaca u patogenezi hronične HE (47,48). Pozitronskom emisionom tomografijom je kod pacijenata sa cirozom jetre i HE uočeno smanjeno iskorišćavanje glukoze u mozgu, najpre u *gyrusu cinguli*, regionu odgovornom za pažnju (49). Tokom progresije encefalopatije iskorišćavanje glukoze se smanjuje u celom korteksu, a povećava se u bazalnim ganglijama, hipokampusu i cerebelumu (50,51). Glavne mete amonijaka u mitohondrijama odgovorne za energetski deficit u ćelijama su enzimi ciklusa trikarboksilnih kiselina i malat-aspartat čunasti mehanizam (52). Amonijak u milimolarnim koncentracijama inhibiše α -ketoglutarat dehidrogenazu, jedan od ključnih enzima u ciklusu trikarboksilnih kiselina, i izaziva manjak ATP-a u ćelijama (42,52). Takođe, usled inhibicije ovog enzima smanjen je i ulazak piruvata u ciklus trikarboksilnih kiselina, što povećava sintezu laktata u mozgu i njihovu koncentraciju u cerebrospinalnoj tečnosti (53). Neke studije naglašavaju smanjenu ekspresiju citohrom c oksidaze u različitim moždanim regionima, što ukazuje na direktan nepovoljan uticaj amonijaka na transport elektrona u

mitohondrijama i ćelijsku respiraciju (54). Međutim, energetska defecit u hiperamonijemiji je uočen jedino u stadijumu kome, što ukazuje da ovo nije ključni faktor u patogenezi blažih oblika HE (42).

1.3.1. Poremećaji neurotransmisije u HE

Savremena istraživanja naglašavaju ulogu poremećaja neurotransmisije, prevashodno glutamatergičke i GABAergičke transmisije, u patogenezi svih stadijuma HE (55–57). U fiziološkim uslovima glutamat je neophodan za procese učenja. Glutamat nakon vezivanja za N-metil-D-aspartatne (NMDA) receptore omogućava ulazak Na^+ i Ca^{2+} u neurone, što rezultuje vezivanjem Ca^{2+} za kalmodulin i aktivacijom neuronske azot monoksid sintaze (nNOS). Azot monoksid (NO) zatim aktivira guanilil-ciklazu i povećava sintezu cGMP u neuronima (58). cGMP aktivira protein kinazu G, koja potom fosforiliše fosfodiesterazu i omogućava razgradnju cGMP. Ovaj inicijalni porast sa sledstvenim smanjenjem nivoa cGMP u neuronima je odgovoran za dugotrajnu potencijaciju u CA1 regionu hipokampusa (59), što predstavlja sinaptičku osnovu učenja.

U akutnoj HE/hiperamonijemiji dolazi do povećanja koncentracije ekstracelularnog glutamata u mozgu i pojačanja glutamatergičke transmisije (60,61). Prekomerna stimulacija NMDA receptora glutamatom uzrokuje nagomilavanje Ca^{2+} u neuronima i aktivaciju Ca^{2+} -zavisnih enzima (proteaze, fosfolipaze, endonukleaze, ATP-aze) (62,63), kao i povećanje propustljivosti unutrašnje mitohondrijske membrane (64). Ovo rezultuje energetskim defecitom u neuronima (65), razgradnjom ćelijskih makromolekula (62), oksidativnim stresom (63) i u krajnjem ishodu nekrozom i apoptozom neurona (ekscitotoksičnost) (38). Povećanje glutamatergičke transmisije u akutnoj HE može se objasniti povećanim oslobađanjem glutamata iz neurona i/ili astrocita i njegovim smanjenim preuzimanjem u astrocitate (40). Pokazano je na presecima moždanog korteksa i hipokampusa da amonijak povećava oslobađanje glutamata egzocitozom zavisnom od Ca^{2+} (40,66), kao i da smanjuje ekspresiju glutamatskog transportera GLT-1 (EAAT-2) na membrani astrocita (67). Takođe, amonijak smanjuje i ekspresiju drugog glutamatskog transportera GLAST na kultivisanim cerebelarnim astrocitima novorođenih pacova (68,69). Smanjen transport glutamata smanjuje i mogućnost detoksikacije amonijaka, s obzirom da se glutamin

sintetaza, enzim koji u mozgu detoksikuje amonijak u reakciji sa glutamatom, pretežno nalazi u astrocitima (40,70).

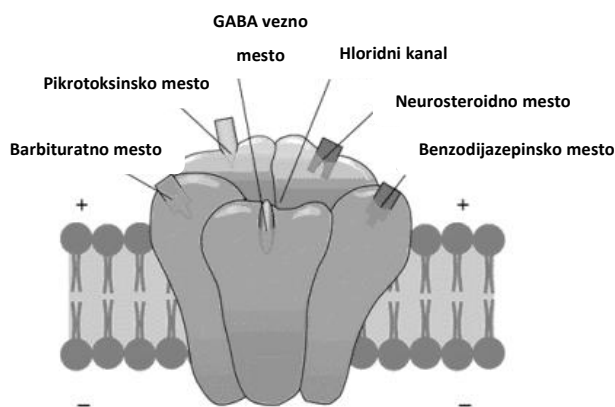
Glutamat svoje ekscitotoksične efekte može ostvarivati i preko metabotropnih receptora (63). Pokazano je da stimulacija mGluR5 pojačava efekte glutamata preko NMDA receptora, tako što oslobađa voltažno-zavisni magnezijumski blok jonskog kanala u okviru NMDA receptora (71). S druge strane, aktivacija NMDA receptora pojačava transmisiju preko mGluR5 receptora, sprečavanjem desenzitizacije ovog receptora (72).

Za razliku od akutne HE/hiperamonijemije, u hroničnoj HE dolazi do smanjenja glutamatergičke transmisije, pre svega na račun smanjenja aktivnosti glutamat-NMDA receptor-azot monoksid (NO)-ciklični guanozin monofosfat (cGMP) signalnog puta (61,73,74). Iako se ranije smatralo da hronična hiperamonijemija smanjuje glutamatergičku transmisiju inhibicijom guanilil ciklaze (75), danas se zna da hiperamonijemija pre svega izaziva poremećaj glutamatergičke transmisije na nivou sinteze NO (73). Ustanovljeno je da dugotrajna aktivacija NMDA receptora u hroničnoj hiperamonijemiji uzrokuje aktivaciju kalcijum-kalmodulin-zavisne protein kinaze II (CaMKII), koja inaktivise nNOS fosforilacijom na Ser847 (73). Inaktivacija nNOS smanjuje sintezu NO i cGMP i doprinosi kognitivnim poremećajima u HE (73,76).

Osim smanjenja efekata glutamata preko NMDA receptora, u hroničnoj HE se menja i aktivnost metabotropnih glutamatskih receptora (mGluR). Ova modulacija aktivnosti mGluR uzrokuje disfunkciju bazalnih ganglija i odgovorna je za motorne promene u HE. U fiziološkim uslovima aktivacija mGluR u *nc. accumbensu* uzrokuje oslobađanje dopamina i gama-aminobuterne kiseline (GABA) u ventralnom palidumu. GABA inhibiše GABA-ergičke neurone u ventralnom palidumu, dovodeći na taj način do dezinhibicije glutamatergičkih neurona u mediodorzalnom talamusu. Povećana glutamatergička aktivnost rezultuje aktivacijom prefrontalnog korteksa i povećanjem motorne aktivnosti (77). Kod pacova sa HE izazvanom portno-kavnim šantom aktiviraju se alternativni neuronski krugovi u bazalnim ganglijama, što uzrokuje motorne poremećaje u HE. Aktivacija mGluR u hiperamonijemiji ne rezultuje oslobađanjem dopamina u *nc. accumbens*, već stimulacijom GABA-ergičkih neurona, koji iz *nc. accumbensa* sežu do *pars reticulata substantiae nigrae*. Oni inhibišu GABA-ergičke inhibitorne neurone u

substantia nigra, dovodeći na taj način do dezinhibicije ventromedijalnog talamusa. Glutamatergički neuroni iz ventromedijalnog talamusa sada snažnije aktiviraju motorne zone u korteksu i dovode do pojave asteriksisa u HE (38,77). Modulacija glutamatergičke aktivnosti u *pars reticulata substantiae nigrae* je odgovorna i za nastanak hipokinezije u HE (78).

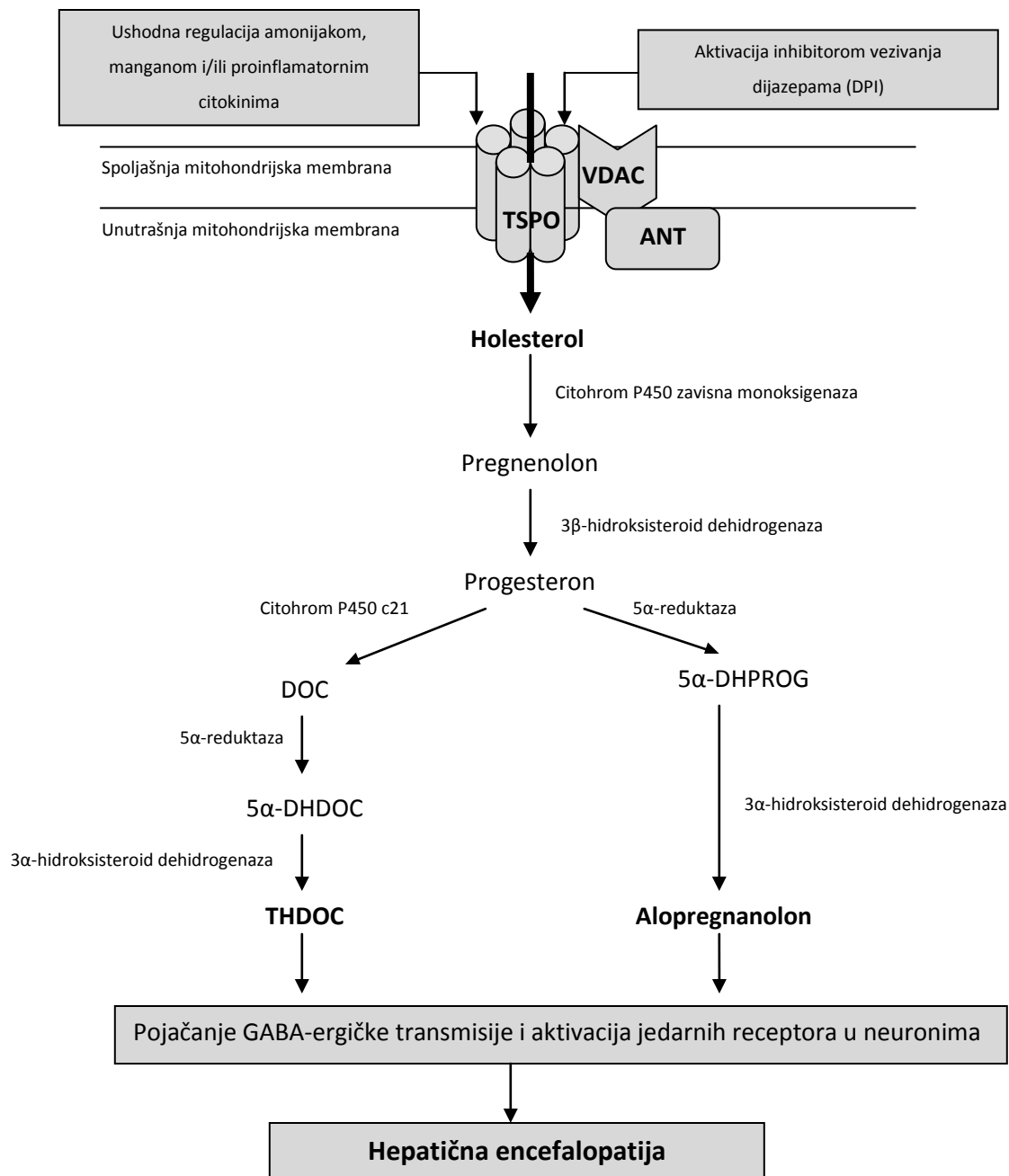
Osim poremećaja glutamatergičke transmisije, patogenezi HE u velikoj meri doprinose i poremećaji GABA-ergičke transmisije, koji se uočavaju već u akutnoj, a znatno izraženiji postaju u hroničnoj HE (38). Modulacija GABA-ergičke aktivnosti u HE se ostvaruje dominantno posredstvom neurosteroida, koji se vezuju za posebno neurosteroidno mesto na GABA_A receptorskom kompleksu (slika 1.1) (79). Neurosteroidi su steroidna jedinjenja, koja se sintetišu u moždanom tkivu iz holesterola, nezavisno od sinteze steroida u perifernim izvorima (gonade i nadbubrežne žlezde) (80,81). Baulieu i sar. (82) su prvi pretpostavili da se steroidna jedinjenja sintetišu u mozgu, s obzirom da je koncentracija pregnenolona, dehidroepiandrosterona (DHEA) i njihovih sulfatnih estara značajno viša u moždanom tkivu nego u serumu. Kasnije je na homogenatima mozga i kulturama astrocita i neurona potvrđeno da se u mozgu nalaze enzimi neophodni za steroidogenezu (83).



Slika 1.1. Struktura GABA_A receptora i vezna mesta za ligande koji modulišu GABA-ergičku transmisiju

Prvi korak u sintezi neurosteroida predstavlja transport holesterola u mitohondrije astrocita. Holesterol se transportuje u mitohondrije pomoću multiproteinskog kompleksa, koji se sastoji od 5-7 subjedinica na spoljašnjoj i unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani (79). U okviru ovog kompleksa nalazi se translokatorski protein (ranije poznat kao benzodijazepinski receptor perifernog tipa), koji je udružen sa voltažno-zavisnim anjonskim kanalom i translokatorom adeninskih nukleotida kao okosnicom ovog kompleksa. Translokatorski protein prenosi holesterol sa spoljašnje na unutrašnju mitohondrijsku membranu (84). Nakon transporta holesterol se u mitohondrijama prevodi u pregnenolon pod dejstvom citohrom P450-zavisne monooksigenaze, a pregnenolon se zatim u glatkom endoplazmatskom retikulumu pod dejstvom enzima 5 α -reduktaze i 3 α -hidroksisteroid dehidrogenaze konvertuje u neurosteroide alopregnanolon (ALLO), tetrahidrodeoksi-kortikosteron (THDOC) i tetrahidroksiprogesteron (84,85) (slika 1.2). Neurosteroidi učestvuju u regulaciji unosa hrane, seksualnog ponašanja, agresivnosti, anksioznosti, telesne temperature i arterijskog pritiska (83).

Utvrđeno je da se koncentracije ALLO i THDOC u mozgu povećavaju u HE pod uticajem hiperamonijemije i drugih neurotoksina (84,86). Hiperamonijemija sinergistički sa manganom u hroničnoj HE (79,87) i proinflamatornim citokinima (interleukin 1 β /IL-1 β / i faktor tumorske nekroze alfa /TNF- α /) u akutnoj HE (84,88) dovodi do ushodne regulacije translokatorskog proteina, što omogućava povećano preuzimanje holesterola u mitohondrije i povećanu sintezu ALLO i THDOC. Ovi neurosteroidi deluju kao pozitivni alosteri modulatori GABA_A receptora, čime dovode do prevage inhibitorne aktivnosti u centralnom nervnom sistemu (CNS) i doprinose patogenezi HE (81,89) (slika 1.2). Povećanju inhibitorne transmisije u HE doprinosi i smanjenje koncentracije dehidroepiandrosteron sulfata, negativnog alosternog modulatora GABA_A receptora (90). Efekti neurosteroida na GABA-ergičku transmisiju su, bar delimično odgovorni za većinu znakova i simptoma u HE, uključujući poremećaje ciklusa budnost-spavanje (91), poremećaje pamćenja (92) i senzorne poremećaje (79).



Slika 1.2. Sinteza neurosteroida i njihova uloga u modulaciji GABA-ergičke transmisije i patogenezi HE (TSPO, translokatorski protein; VDAC, voltažno-zavisni anjonski kanal; ANT, translokator adeninskih nukleotida; DOC, deoksikortikosteron; 5α-DHDOC, 5α-dihidrodeoksikortikosteron; THDOC, tetrahydrodeoksikortikosteron; 5α-DHPROG, 5α-dihidroprogesteron) (modifikovano prema Ahboucha i Butterworth, 2008).

Osim uticaja na GABA-ergičku transmisiju, neurosteroidi utiču i na gensku ekspresiju u mozgu. U akutnoj insuficijenciji jetre se smanjuje ekspresija gena za glijalni fibrilarni kiseli protein (*engl.* glial fibrillary acidic protein, GFAP), transporter za glukozu (GLUT-1), akvaporin IV, glutamatski (EAAT-2) i glicinski transporter u astrocitima (93), kao i gena za neuronske enzime monoaminoooksidazu A (MAO-A) i nNOS (94). Tačan posrednik u modulaciji genske ekspresije nije poznat, ali je uočeno da progesteron i njegovi metaboliti menjaju ekspresiju gena za GFAP (95) i akvaporin IV (96), dok aktivacija glukokortikoidnih receptora menja ekspresiju GLUT-1 (97) i MAO-A (98). ALLO moduliše gensku ekspresiju aktivacijom pregnan-X receptora u jedru (99). Ove promene genske ekspresije mogu potencijalno doprinositi bubrenju astrocita u akutnoj HE (100,101).

Iako neurosteroidi imaju glavnu ulogu u modulaciji GABA-ergičke transmisije u HE, endogeni „benzodijazepini“ i amonijak direktno mogu doprinositi povećanju inhibicije u CNS-u (79). Do danas dokazani endogeni agonisti benzodijazepinskih receptora perifernog tipa (translokatorskog proteina) su inhibitor vezivanja dijazepama (*engl.* Diazepam Binding Inhibitor, DBI) i porfirini (102). DBI je polipeptid sastavljen od 86 aminokiselina, koji se sintetiše pretežno u glijalnim ćelijama, a u manjoj meri u neuronima (103) i koji aktivira translokatorski protein (slika 1.2) (79). Pokazano je da koncentracija ovog peptida u cerebrospinalnoj tečnosti raste do pet puta u hepatičnoj komi i da koreliše sa stepenom HE (104). Njegovom razgradnjom nastaje oktadekaneuropeptid, koji takođe stimuliše sintezu neurosteroida aktivacijom translokatorskog proteina (101,102).

Amonijak ne menja afinitet vezivanja GABA za svoje vezno mesto, ali zato deluje sinergistički sa ALLO u promeni afiniteta benzodijazepinskog veznog mesta na GABA_A receptorskom kompleksu (79). Uticaji hiperamonijemije na broj i strukturu GABA receptora su još uvek nedovoljno rasvetljeni. Dok su neke studije utvrdile ushodnu regulaciju GABA_A receptora (105), druge nisu dokazale promenu broja ovih receptora u HE (106,107). Takođe, uočene su i povećana ekspresija gena za transporter GABA-e (GAT-2), kao i smanjena ekspresija gena za GABA_{B1D} i β 2 subjedinicu GABA_A receptora (108). GABA, benzodijazepinsko i neurosteroidno vezno mesto na GABA_A receptorskom kompleksu nisu funkcionalno izmenjeni u HE (107,109).

Osim poremećaja glutamatergičke i GABA-ergičke transmisije u HE su takođe uočeni poremećaji adrenergičke, holinergičke, dopaminergičke, serotoninergičke i purinergičke transmisije (110). Koncentracije noradrenalina u različitim moždanim regionima su povećane u eksperimentalnoj HE (111), dok je ekspresija α_1 i β_1 receptora u frontalnom korteksu i talamusu smanjena (112). Takođe, utvrđeno je i povećanje nivoa acetilholina (113) i aktivnosti acetilholinesteraze u mozgu u HE (114). Na poremećaje dopaminergičke transmisije u HE ukazuje povećanje nivoa dopamina i njegovog prekursora 3,4-dihidroksifenilalanina u mozgu u akutnoj insuficijenciji jetre (111). U humanoj populaciji utvrđeno je smanjenje broja dopaminskih D_1 i D_2 receptora u putamenu (110), a kod pacova smanjenje D_4 receptora u cerebralnom korteksu (108). Poremećaji serotoninergičke aktivnosti u eksperimentalnoj i humanoj HE obuhvataju: povećanu ekspresiju gena za serotoniniski transporter i serotoniniski 5-HT_{5B} receptor u cerebralnom korteksu (108), smanjenu ekspresiju 5-HT_{1A} receptora u putamenu (110) i prolazno povećanje nivoa ekstracelularnog serotonina (112). Iako ondansetron, antagonist 5-HT₃ receptora, poboljšava kliničku sliku HE (115), biohemijske studije su dvosmislene i ukazuju kako na povećanje, tako i na smanjenje serotoninergičke transmisije u HE (79). Adenozin kao neuromodulator pojačava disbalans između ekscitacije i inhibicije u CNS-u u HE. Na uzorcima mozga dobijenim autopsijom pacijenata koji su umrli u hepatičnoj komi utvrđeno je smanjenje ekspresije adenzinskih A_1 receptora u korteksu i strijatumu i smanjenje ekspresije A_{2A} receptora u strijatumu (110). Kod pacova sa portno-kavnim šantom uočeno je smanjenje ekspresije gena za A_3 receptor u cerebralnom korteksu (108).

1.3.2. Oksidacijski stres, mitohondrijska disfunkcija i inflamacija u HE

Mozak je veoma osetljiv na oksidacijski stres zbog velike potrošnje O_2 (oko 20% ukupne potrošnje O_2 u organizmu (116), visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina i gvožđa i niske aktivnosti antioksidacijskih i reparacionih enzima u mozgu (116,117). Povećana produkcija slobodnih radikala uočena je *in vivo* u mozgu pacova sa akutnom hiperamonijemijom, kao i *in vitro* u astrocitima izloženim NH_4Cl . Razvoju oksidacijskog stresa u HE doprinose: amonijak, povećanje intracelularne koncentracije Ca^{2+} i mitohondrijska disfunkcija, proinflamatorni citokini (TNF- α , interferoni), endogeni

benzodijazepini, kao i smanjenje redukovano glutationa (GSH) (118). Glutamat preko NMDA receptora predstavlja važan primarni činilac u razvoju oksidacijskog stresa preko povećanja koncentracije intracelularnog Ca^{2+} (118). Oksidacijski stres je tesno povezan sa nitrozativnim stresom u patogenezi HE. Slobodni radikali izazivaju aktivaciju NF- κ B, koji zatim stimuliše transkripciju gena za inducibilnu NOS (iNOS) i povećava produkciju NO. Superoksidni anjon ulazi u reakciju sa NO, gradeći peroksinitrite, reaktivna azotna jedinjenja (43).

Novija istraživanja naglašavaju vezu između bubrenja astrocита i oksidacijskog/nitrozativnog stresa (43,119). Bubrenje astrocита uzrokuje aktivaciju nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze, enzima koji povećava produkciju superoksidnog anjona. Reaktivna kiseonična i azotna jedinjenja preko NF- κ B doprinose bubrenju astrocита, stvarajući na taj način *circulus vitiosus* u kome oksidacijski stres pogoršava edem mozga (43,119,120). Osim ovoga, slobodni radikali uzrokuju oštećenje makromolekula u astrocitima i neuronima, uključujući oksidaciju ribonukleinske kiseline (RNK), nitraciju tirozinskih ostataka u proteinima, promenu transkripcije gena, mobilizaciju cinka i promene u intracelularnoj (MAP kinazni signalni put) i intercelularnoj signalizaciji (43,119). Nitracija uzrokuje disfunkciju glutamin sintetaze, što predstavlja jedan od uzroka smanjene detoksikacije amonijaka u CNS-u (118). Oksidacijsko oštećenje proteina smanjuje efikasnost sinaptičke transmisije, što doprinosi otežanom upamćivanju novih informacija u HE (43).

Povećanje propustljivosti unutrašnje mitohondrijske membrane je usko povezano sa oksidacijskim stresom u HE (46). Propustljivost unutrašnje mitohondrijske membrane se povećava zahvaljujući otvaranju specifične pore (megakanala) sastavljene od većeg broja proteina na spoljašnjoj i unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani, koja omogućava prolaz molekula molekulske mase do 1500 Da. Glavni proteini ove pore su translokator adeninskih nukleotida, periferni benzodijazepinski receptor (translokatorski protein) i voltažno-zavisni anjonski kanal (porin), dok su pridruženi proteini u okviru ovog kompleksa produkt tumor-supresorskog gena bcl-2, heksokinaza i kreatin kinaza (46). Stimulusi za formiranje ove pore su povećana mitohondrijska koncentracija Ca^{2+} , oksidacijski stres (posebno redoks stanje tiola i piridinskih nukleotida) i visok pH u

mitohondrijskom matriksu (46,121), dok je najspecifičniji inhibitor ove pore ciklosporin A, koji sprečava vezivanje ciklofilina D za proteinski kompleks pore (122,123). Posledice povećanja propustljivosti unutrašnje mitohondrijske membrane su smanjenje transmembranskog potencijala kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu (46), bubrenje mitohondrija (124) i difuzija jona, nukleotida i manjih proteina (46). Kao posledica difuzije H⁺ jona iz međumembranskog prostora u matriks mitohondrija suprimirana je oksidativna fosforilacija, a povećano je stvaranje slobodnih radikala (46,125). Oksidacijski stres dalje dodatno povećava propustljivost unutrašnje mitohondrijske membrane i ćelijsku disfunkciju sa mogućnošću razvoja apoptoze i nekroze (125,126). Apoptoza se razvija kao posledica oslobađanja citohroma c iz međumembranskog prostora u citoplazmu (126) i aktivacije kaspaze 9.

Studije na kulturi astrocita su pokazale da amonijak snižava transmembransku razliku potencijala kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu, kao i da pretretman ciklosporinom sprečava ovu promenu i ublažava bubrenje astrocita (127), što ukazuje da povećanje propustljivosti unutrašnje mitohondrijske membrane doprinosi patogenezi HE. Povećanje propustljivosti mitohondrijske membrane u HE je posledica formiranja glutamina u astrocitima (127), povećanja intracelularnog Ca²⁺ usled stimulacije NMDA receptora (64), oksidacijskog stresa (125), dejstva citokina (128), energetske deficita (46) i povećane ekspresije translokatorskog proteina (129). Moguće je i da hiperamonijemija doprinosi povećanju propustljivosti unutrašnje mitohondrijske membrane alkalizacijom mitohondrijskog matriksa (46).

1.3.3. Uloga neuroinflamacije u patogenezi HE

Novija istraživanja naglašavaju ulogu neuroinflamacije u patogenezi HE i njenu povezanost sa oksidacijskim stresom i mitohondrijskom disfunkcijom (128). Uočeno je povećanje nivoa IL-6 i TNF- α u serumu pacijenata sa minimalnom HE kao i njihova korelacija sa koncentracijom amonijaka u krvi i glutamina u mozgu (45). Postoje dve teorije kojima se objašnjava razvoj neuroinflamacije u HE. Prema jednoj teoriji neuroinflamacija se razvija kao posledica sistemskog zapaljenjskog odgovora u insuficijenciji jetre (130). Mehanizmi kojima citokini iz krvi podstiču zapaljenjski odgovor

u mozgu nisu potpuno rasvetljeni, ali navode se direktni i indirektni efekti. Direktne efekte citokini ostvaruju nakon aktivnog transporta kroz moždane kapilare ili nakon vezivanja za receptore na endotelnim ćelijama u cirkumventrikularnim organima, a indirektne posredstvom aferentnih vlakana vagusa (130). Sistemska inflamacija može uzrokovati i povećanje propustljivosti krvno-moždane barijere (131). Prema drugoj teoriji neuroinflamacija je posledica aktivacije mikroglije toksinima, koji se nakupljaju u mozgu u insuficijenciji jetre (amonijak, laktati, mangan, glutamat i neurosteroidi) (132). Aktivirana mikroglija sintetiše i oslobađa IL-1, TNF- α , IL-6 i hemokine, koji privlače monocite kao dodatne izvore proinflamatornih citokina u moždano tkivo (133–135). Ovi citokini sinergistički sa amonijakom povećavaju propustljivost unutrašnje mitohondrijske membrane i aktivnost hem oksigenaze 1 (HO-1), markera oksidacijskog stresa, u astrocitima (128) i pogoršavaju energetske poremećaje u HE. Neuroinflamacija doprinosi pojavi kognitivnih i motornih poremećaja u HE, koji mogu da perzistiraju i posle transplantacije jetre (136). U akutnoj insuficijenciji jetre pretpostavlja se da proinflamatorni citokini doprinose razvoju vazogenog edema mozga posredstvom NO i prostaglandina, koji se sintetišu u endotelnim ćelijama krvnih sudova mozga (137).

1.3.4. Uloga aminokiselina u patogenezi HE

Osim hiperamonijemiji, manganu i proinflamatornim citokinima uloga u patogenezi HE se pripisuje i aromatičnim aminokiselinama i triptofanu. Još James i sar. su ustanovili da se u HE povećava transport velikih neutralnih aminokiselina (npr. triptofana) kroz krvno-moždanu barijeru (138). Takođe, u HE se povećava odnos koncentracija aromatičnih i razgranatih aminokiselina u mozgu (139). Iako značaj ovih promena u patogenezi HE nije u potpunosti rasvetljen, pretpostavlja se da one doprinose poremećajima neurotransmisije (140). Povećanje nivoa triptofana u mozgu rezultuje povećanom sintezom serotonina i poremećajima serotoninergičke transmisije (141), a povećanje nivoa aromatičnih aminokiselina uzrokuje sintezu lažnih neurotransmitera, jedinjenja koja su neaktivna ili čiji se efekat u neurotransmisiji razlikuje od pravih transmitera (140). U lažne neurotransmitere ubrajaju se oktopamin, tiramin i feniletanolamin, koji nastaju modifikacijom tirozina i fenilalanina (142). Mehanizam povećanja koncentracije triptofana i aromatičnih

aminokiselina takođe nije potpuno poznat, ali se povezuje sa transportom glutamina iz moždanog tkiva. Porast nivoa glutamina u mozgu usled detoksikacije amonijaka stimuliše transport glutamina kroz krvno-moždanu barijeru u zamenu za triptofan i aromatične aminokiseline preko L-transportnog sistema (140,143).

1.4. Eksperimentalni modeli HE

Do danas nije utvrđen idealan eksperimentalni model HE. U dosadašnjim istraživanjima patogeneze HE korišćeni su psi (144), kunići (145), svinje (146), kao i sitnije životinje (pacovi i miševi) (147,148). Prednost upotrebe velikih životinja sastoji se u jednostavnijem prikupljanju uzoraka krvi, jetre, mozga i drugih organa za analize, kao i u lakšoj primeni neurofizioloških metoda u dijagnozi HE. Takođe, eksperimenti na velikim životinjama omogućavaju i lakše izvođenje bihejvioralnih testova (149). Ipak najveći broj istraživanja o HE se danas sprovodi na pacovima i miševima (120,150,151). Glodari su pogodne životinje za ispitivanje patogeneze HE zbog dostupnosti podataka o biohemijским, patoanatomskim i bihejvioralnim odlikama ovih životinja, kao i zbog potpunog poznavanja njihovog genoma (149).

Razvijeni su brojni modeli pogodni za istraživanje akutne ili hronične HE (149,152). Kriterijumi koje mora da zadovolji dobar model akutne HE (tip A HE) uključuju: razvoj hiperamonijemije, reproducibilnost kliničke slike, razvoj edema mozga i njegovih komplikacija, reverzibilnost promena sa mogućnošću ispitivanja efikasnosti terapijskih procedura, sličnost patoanatomskih promena u mozgu i jetri sa humanom HE i bezbednost za izvođače eksperimenta (149). Modeli koji u velikoj meri zadovoljavaju ove kriterijume su: HE izazvana devaskularizacijom jetre (153), modeli HE izazvani D-galaktozaminom (154), acetaminofenom (155), azoksimetanom (156) i tioacetamidom (TAA) (157).

Devaskularizacija jetre se postiže formiranjem portno-kavnih anastomoza i podvezivanjem hepatične arterije (149). Ova procedura rezultuje bubrenjem astrocita, edemom mozga i porastom intrakranijalnog pritiska, kao i razvojem EEG promena koje odgovaraju akutnoj HE u humanoј populaciji (149,153). Koncentracije amonijaka u krvi su slične onima koje su izmerene kod ljudi u insuficijenciji jetre (158). Slične promene se

uočavaju nakon hepatektomije (159). Ovaj model je korišćen za proučavanje energetskih poremećaja, poremećaja neurotransmisije i inflamacije u akutnoj HE (149,160). Glavni nedostatak ovog modela je ireverzibilnost encefalopatije (149).

Modeli HE izazvani toksinima se često koriste u praksi zbog jednostavnosti primene supstanci. Administracija D-galaktozamina uzrokuje insuficijenciju jetre praćenu bubrenjem astrocита kod pacova i kunića (154,161). Bolje je okarakterisan model na kuniću gde je edem ograničen na sivu masu mozga (154). Propustljivost krvno-moždane barijere se povećava u bazalnim ganglijama što nije čest nalaz u humanoј HE (162). Acetaminofen izaziva masivnu centrolobularnu nekrozu u jetri i encefalopatiju koja se karakteriše različitim stepenom edema mozga (155). Patohistološke promene u mozgu na ovom modelu nisu dobro okarakterisane. Jedan od novijih modela je HE izazvana azoksimetanom, koji po patohistološkim karakteristikama odgovara promenama u humanoј HE. Ovaj model se koristi za ispitivanje genskih manipulacija koje potencijalno menjaju tok HE (156). Drugi toksini koji se koriste za indukciju akutne insuficijencije jetre su CCl₄ (163), fosfor i nitrozamini (149), ali ovi modeli nisu dovoljno ispitani. Uočeno je da CCl₄ menja transkripciju različitih gena u astrocitima (163). Osnovne mane svih modela akutne HE su razvoj hipotermije, hipoglikemije, akutne bubrežne insuficijencije i drugih sistemskih komplikacija, koje se mogu sprečiti odgovarajućim preventivnim merama (infuzija 0,9% rastvora glukoze, kontrola telesne temperature) (149).

TAA je sumporno jedinjenje, koje se koristi u poljoprivredi kao pesticid i u industriji gume, papira i u metalurgiji. Hepatotoksični efekti TAA su dokazani u različitim životinjskim vrstama i uglavnom se ispoljavaju premošćavajućom (*engl. bridging*) nekrozom i limfocitnim infiltratom bez holestaze (164). TAA svoje efekte izaziva indirektno posredstvom svojih metabolita i insuficijencija jetre izazvana TAA-om je pogodan model za ispitivanje patogeneze HE (157,165).

Validnost eksperimentalnih modela hronične HE se procenjuje na osnovu patohistoloških, bihejvioralnih i biohemijskih promena. Kriterijumi koje treba da zadovoljava dobar model hronične HE obuhvataju: hiperamonijemiju, patohistološke promene u jetri koje ukazuju na hronicitet procesa (fibroza, regeneracija hepatocita) sa portno-sistemskim šantovima, bihejvioralne promene koje odgovaraju HE u humanoј

populaciji, razvoj Alchajmer tip II astrocitoze u komi, prisustvo provocirajućeg faktora za razvoj HE i ublažavanje bihevioralnih promena nakon primene utvrđenih terapijskih sredstava u HE (149). Psi i mačke sa kongenitalnim portno-kavnim šantom predstavljaju prirodne modele tipa B HE (149). Postepena stenoza portne vene i bočna portno-kavna anastomoza kod pacova oponašaju tip B HE u eksperimentalnim uslovima (166). Portno-kavna anastomoza izaziva hiperamonijemiju, porast nivoa glutamina u mozgu, poremećaje spavanja i cirkadijalnog ritma, kognitivne poremećaje, slabljenje refleksa i atrofiju testisa, promene koje se javljaju i u humanoj populaciji. Takođe, ova eksperimentalna procedura je praćena i promenom odnosa aromatičnih i razgranatih aminokiselina u serumu, pojavom oksidacijskog i nitrozativnog stresa u mozgu i poremećajima neurotransmisije, što omogućava izučavanje kompleksnih patogenetskih mehanizama u HE (149,167,168).

Za sada ne postoji dobar model tipa C HE. Jedan od prihvatljivih upotrebljivanih modela je podvezivanje holedohusa, koji se karakteriše razvojem sekundarne bilijarne ciroze (169). Na ovom modelu razvijaju se brojne promene koje karakterišu cirozu u humanoj populaciji, kao što su žutica, portna hipertenzija (169), portno-sistemiški šantovi (170), povećanje nivoa endotoksina u cirkulaciji i disfunkcija imunskog sistema (171). Primena amonijum soli kod ovih životinja pogoršava bihevioralne promene i predstavlja dobar model akutne HE, koja se nadovezuje na hroničnu, i karakteriše se Alchajmer tip II astrocitozom, niskostepenim edemom mozga i inflamacijom (172). Takođe, u praksi je korišćen i model ciroze jetre izazvan CCl_4 , koji je bolje opisan nego sličan model tipa A HE (152).

Osim ovih modela u proučavanju patogeneze HE koriste se i hiperamonijemične životinje bez oštećenja jetre (173). Ovi modeli su pogodni za ispitivanje isključivo uticaja hiperamonijemije kao ključnog poremećaja u HE na moždanu funkciju. Mogu se koristiti za proučavanje poremećaja glutamatergičke i GABA-ergičke transmisije i drugih mehanizama razvoja kognitivnih poremećaja u HE (56,173). Za ispitivanje molekularnih mehanizama dejstva amonijaka i drugih toksina koriste se kultivisani astrociti (41), ćelije glioma (174), kao i preseci mozga (175). Na posebno pripremljenim vitalnim presecima mozga dobijenim od životinja sa HE mogu se proučavati mehanizmi edema mozga (175), oštećenja neurona (176), signalni putevi (177) i karakteristike astrocita u HE (178). Glavna

mana korišćenja kultivisanih ćelija je nemogućnost integrativnog sagledavanja kompleksnosti mehanizama HE, a preseka mozga njihova kratkotrajna vijabilnost (149).

1.5. Efekti finasterida na neurotransmisiju

Finasterid (FIN), inhibitor 5α -reduktaze, se koristi u terapiji androgene alopecije (179) i hiperplazije prostate (180). Osim u perifernim organima, FIN blokira 5α -reduktazu i u CNS-u, inhibiše sintezu ALLO i THDOC na dozno-zavistan način i preusmerava progesteron u alternativne metaboličke puteve. Dok se nivo progesterona i deoksikortikosterona u mozgu ne menja nakon tretmana FIN, nivo 20α -dihidroprogesterona raste. Značaj ovog preusmeravanja progesterona u 20α -redukciju nije poznat, ali pretpostavlja se da na ovaj način nastaju neaktivni metaboliti neurosteroida (181). U humanoju populaciji je uočeno da aktivnost 20α -hidroksisteroid dehidrogenaze poseduje aldo-keto reduktaza 1C1, koja inaktivniše ALLO i preusmerava progesteron u kataboličke puteve (182). Takođe, nivo ALLO u mozgu se smanjuje i usled hidrosilacije progesterona pomoću izoforme 2D citohrom P450-zavisne monooksigenaze (183). Na ovaj način FIN moduliše GABA-ergičku transmisiju i utiče na emocionalno stanje (184), tok epilepsije (185), transmisiju bola u CNS-u (186) i smanjuje unos etanola kod miševa (187). Iako FIN ne izaziva spontane epileptičke napade kod pacova (188), tretman FIN-om povećava učestalost konvulzija u litijum-pilokarpinskom modelu epilepsije (189). Pokazano je da su u bazalnim uslovima niske koncentracije neurosteroida dovoljne za modulaciju GABA-ergičke aktivnosti i prevenciju epileptičkih pražnjenja. U epilepsiji osetljivost $GABA_A$ receptora na neurosteroidne se smanjuje, čime se objašnjava pogoršanje epilepsije nakon inhibicije sinteze neurosteroida FIN-om (190,191).

FIN takođe izaziva hiperalgeziju kod pacova modulacijom transmisije bola u kičmenoj moždini (192). Poznato je da neurosteroidi suprimiraju prenos bola u kičmenoj moždini (192,193). Neuropatski bol izaziva povećanje aktivnosti citohrom P450-zavisne monooksigenaze i/ili 3α -hidroksisteroid oksidoreduktaze i porast nivoa neurosteroida, koji alosternom modulacijom aktivnosti $GABA_A$ receptora inhibišu transmisiju bola (194,195). Bol izazvan formalinom kod pacova takođe povećava aktivnost 5α -reduktaze i sintezu

ALLO (196). FIN pojačava ovaj bol, što ukazuje da se modulacija aktivnosti 5 α -reduktaze može koristiti u terapiji bola (192).

Efekti FIN na unos alkohola i razvoj zavisnosti kod miševa zavisi od režima njegove primene. Akutna primena FIN smanjuje voljni unos etanola kod miševa kod kojih se prethodno razvila zavisnost. Ovo se može objasniti preklapanjem efekata neurosteroida i alkohola na GABA-ergičku transmisiju (187). Alkohol ima bifazni efekat na GABA-ergičku transmisiju sa direktnom aktivacijom GABA_A receptora u prvom koraku i indirektnom aktivacijom posredstvom neurosteroida u drugom koraku (197). S druge strane hroničnom primenom se značajno smanjuju efekti FIN na unos alkohola. Moguća objašnjenja za smanjenje efekata FIN mogu biti razvoj tolerancije na FIN i kompenzatorne promene u strukturi GABA_A receptora, kojima se povećava osetljivost ovih receptora na etanol (187,198). Skorašnje studije su pokazale da FIN ima uticaja i na unos etanola kod ljudi. FIN smanjuje subjektivan osećaj prijatnosti nakon umerenog konzumiranja alkohola kod ljudi koji poseduju alel za α_2 subjedinicu GABA_A receptora (199). Takođe, uočeno je da je alkoholna apstinencija praćena smanjenjem nivoa ALLO u plazmi, koje koreliše sa anksioznošću i depresijom, što govori u prilog povoljnog uticaja FIN u alkoholnoj apstinenciji (200).

Osim ovoga, FIN ispoljava i antipsihotično dejstvo i predstavlja potencijalno pomoćno sredstvo u terapiji shizofrenije, maničnih poremećaja i Turetovog (Tourette) sindroma (201). FIN moduliše dopaminergičku transmisiju direktnim i indirektnim mehanizmima, koji još uvek nisu dovoljno rasvetljeni, s obzirom da FIN nespecifično blokira redukciju androgena, progestagena i glukokortikoida (202).

2. CILJEVI

Efekti FIN na tok HE nisu utvrđeni. S obzirom da FIN inhibiše sintezu ALLO i THDOC, neurosteroida koji doprinose povećanju inhibitorne transmisije u HE, može se pretpostaviti da bi FIN imao potencijalno neuroprotektivno i terapijsko dejstvo u HE. Stoga su ciljevi ove disertacije bili:

- Ispitati bihevioralne odgovore u HE izazvanoj TAA kod pacova upotrebom baterije specifičnih testova
- Registrovati EEG promene: vizuelno i pomoću softvera odrediti spektralnu snagu kao i frekventni opseg dominirajućih talasa u HE izazvanoj TAA kod pacova
- Odrediti parametre oksidacijskog stresa i antioksidacijske zaštite i aktivnost acetilholinesteraze u hipokampusu, moždanoj kori, talamusu, *nc. caudatusu* i moždanom stablu u intoksikaciji TAA
- Odrediti ekspresiju ćelijskih markera u moždanoj kori i hipokampusu u intoksikaciji TAA
- Ispitati uticaj finasterida na bihevioralne, EEG i ćelijske promene u HE izazvanoj TAA kod pacova

3.MATERIJAL I METODE

3.1. Korišćene supstance

Tioacetamid, finasterid i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin su nabavljeni od Sigma Aldrich Co., SAD. Fenilmetilsulfonil fluorid (P7626), koktel inhibitora proteaza (P8340) i natrijum ortovanadat su nabavljeni od Sigma Aldrich Co., Nemačka, a NaF od Mercka, SAD. Poliklonsko kozje anti-SOD1, poliklonsko kozje anti-SOD2, poliklonsko zečje anti-p67-phox, poliklonsko zečje anti-p47-phox, poliklonsko zečje anti-p40-phox i poliklonsko zečje anti-p22-phox antitelo su nabavljena od Santa Cruz, Kalifornija, SAD. Monoklonsko mišje anti-NeuN antitelo je nabavljeno od Chemicon, SAD, poliklonsko zečje anti-GFAP od Dakko, Danska, a poliklonsko kozje anti-Iba1 i monoklonsko mišje anti-MOG antitelo su nabavljeni od Abcam, Velika Britanija. Sekundarna anti-zečja, anti-kozja i anti-mišja antitela su nabavljena od Southern Biotech SAD.

3.2. Eksperimentalne životinje

Eksperimenti su sprovedeni na odraslim mužjacima pacova Wistar soja, mase 170-200 g, koji su nabavljeni iz vivarijuma Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Životinje su čuvane pojedinačno, u kavezima od pleksiglasa (55x35x30cm) u standardnim laboratorijskim uslovima (temperatura $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, relativna vlažnost vazduha 50%, 12/12 h ciklusi svetlost/tama, sa svetlom uključenim u 9 h), pri čemu su im voda i hrana bili dostupni *ad libitum*. Sve eksperimentalne procedure su bile u skladu sa Direktivom Evropskog parlamenta (2010/63/EU) i odobrene od strane Etičkog komiteta Univerziteta u Beogradu (dozvola broj 1891/2).

3.2.1. Uticaj TAA na ponašanje, EEG i parametre oksidacijskog stresa u mozgu

U cilju ispitivanja encefalopatije izazvane TAA, životinje (n=44) su nasumično podeljene u sledeće grupe: 1. kontrolna grupa (n=8), tretirana fiziološkim rastvorom; 2. eksperimentalna grupa tretirana TAA na dozno zavisian način: TAA₃₀₀ (300 mg/kg, n=8), TAA₆₀₀ (600 mg/kg, n=10) i TAA₉₀₀ (900 mg/kg, n=18). Dnevne doze TAA (300 mg/kg) su primenjene tokom jednog (TAA₃₀₀), dva (TAA₆₀₀) ili tri uzastopna dana (TAA₉₀₀) intraperitonealno. Pre administracije TAA je rastvoren u fiziološkom rastvoru u

koncentraciji od 100 mg/mL. Bihejvioralne manifestacije su praćene 0, 2, 4, 6 i 24 h nakon primene poslednje doze TAA. Neposredno pre izvođenja testova merena je rektalna temperatura pacova kako bi se uočila eventualna hipotermija kao neželjeni efekat primene TAA. EEG je registrovan 22-24 h nakon tretmana, s obzirom da je u našoj pilot studiji uočeno da su bihejvioralne manifestacije encefalopatije izazvane TAA najizraženije u periodu oko 24 h nakon tretmana. Uzorci krvi za određivanje koncentracije amonijaka u plazmi su uzeti iz desne komore srca 24 h nakon primene poslednje doze TAA, a potom su životinje žrtvovane. Uzorci jetre su prikupljeni za patohistološku analizu, kao i uzorci mozga za određivanje lipidne peroksidacije i aktivnosti katalaze. Koncentracija amonijaka u plazmi, kao pokazatelja insuficijencije jetre, je određena enzimskim testom (BioMerieux Lab., France).

Uzorci jetre za patohistologiju su fiksirani u 10% puferisanom formalinu i ukalupljeni u parafinu. Isečci tkiva debljine 5 μ m su bojeni hematoksilinom i eozinom (HE bojenje) i posmatrani pod svetlosnim mikroskopom Olympus BX41.

Lipidna peroksidacija i aktivnost katalaze su određeni u moždanoj kori, hipokampusu i moždanom stablu.

3.2.2. Uticaj finasterida na bihejvioralne, EEG i ćelijske promene u HE izazvanoj TAA-om

U cilju ispitivanja uticaja finasterida na HE izazvanu TAA-om, životinje (n=44) su podeljene u sledeće grupe: 1. kontrolna grupa (n=8), tretirana 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom i fiziološkim rastvorom; 2. TAA₉₀₀ grupa tretirana TAA (900 mg/kg, n=18); 3. grupa tretirana finasteridom, FIN (150 mg/kg, n=8); 4. FIN+TAA₉₀₀ grupa (n=10) tretirana finasteridom (150 mg/kg) i TAA (900 mg/kg). Dnevne doze TAA (300 mg/kg) i finasterida (50 mg/kg) su administrirane tokom tri uzastopna dana. U FIN+TAA₉₀₀ grupi finasterid (50 mg/kg) je primenjen 2 h pre svake pojedinačne doze TAA (300 mg/kg). Ova doza TAA je izabrana, jer je u našoj pilot studiji pokazano da ona izaziva izražene manifestacije HE, uključujući i hepatičnu komu. Doza FIN je određena na osnovu ranije studije koja je pokazala da ova doza snižava nivo ALLO u plazmi i mozgu za 66% i 80% u toku 24 h (203). Pre primene TAA je rastvoren u fiziološkom rastvoru (0,9% NaCl) u

koncentraciji od 100 mg/mL, dok je finasterid rastvoren u 20% rastvoru 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina u 0,9% NaCl. Sve supstance su primenjene intraperitonealno.

Bihejvioralne karakteristike su praćene 0, 2, 4, 6 i 24 h nakon tretmana, dok je EEG registrovan u periodu 22-24 h nakon tretmana. Krv iz desne polovine srca, kao i uzorci jetre za patohistološku analizu i uzorci mozga za određivanje parametara oksidacijskog stresa, aktivnosti acetilholinesteraze i ekspresiju ćelijskih markera su uzeti 24 h nakon tretmana. Parametri oksidacijskog stresa i aktivnost acetilholinesteraze su određeni u hipokampusu, moždanoj kori, talamusu i *nc. caudatusu*. Ekspresije **NeuN** (engl. *neuronal nuclear antigen*) kao markera neurona, **MOG** (engl. *myelin oligodendrocyte glycoprotein*) kao markera oligodendrocita, **Iba 1** (engl. *ionized calcium binding adaptor molecule 1*) kao markera mikroglije i **GFAP** (engl. *glial fibrillary acidic protein*) kao markera astrocita, kao i ekspresija subjedinica NADPH oksidaze i izoenzima superoksid dizmutaze u hipokampusu i moždanoj kori su određene Western blot metodom.

3.3. Bihejvioralni testovi

Bihejvioralne promene su ispitivane korišćenjem baterije testova prema Nortonu i sar (204). Ova baterija sadrži sledeće testove: refleks uklanjanja, auditivni refleks, refleksne trzaje glavom, kornealni refleks, ekvilibrijumski test, refleks hvatanja, refleks uspravljanja, refleks postavljanja, test opšte motorne aktivnosti i test eksplorativnog ponašanja. Izvođenje ekvilibrijumskog testa, kao i pojava refleksa uspravljanja, hvatanja i postavljanja su praćeni u periodu od 300 s.

Refleks uklanjanja je ispitivan tako što je životinji na ravnoj podlozi uštinut rep peanom. Kao fiziološki odgovor na bolnu draž životinja pomera rep ili se cela udaljava od izvora draži.

Auditivni refleks je ispitivan tako što se životinja na ravnoj podlozi u mirovanju izloži kratkotrajnom izvoru snažnog zvuka. Fiziološki odgovor na ovakav zvuk podrazumeva trzaje tela i kratkotrajnu fleksiju kičmenog stuba sa zauzimanjem lučnog položaja.

Refleksni trzaji glavom se ispituju laganim uduvavanjem vazduha u uho pacova. Fiziološki odgovor na ovu draž je predstavljen trzajima glave, koji traju sve vreme trajanja draži.

Kornealni refleks je ispitan laganim dodirivanjem rožnjače zašiljenim komadićem vate. Brzo spuštanje gornjeg kapka predstavlja fiziološki odgovor na ovu draž.

Ekvilibrijumski test započinje postavljanjem životinje na horizontalnu podlogu, koja se potom iskosu za 30°. Odgovor na iskošenje podloge treba da bude okretanje glave u pravcu kosine uz očuvanje ravnoteže. Test traje najduže 300 s, a tokom testa meri se vreme koje protekne od iskošenja podloge do okretanja glave.

Za ispitivanje refleksa hvatanja životinja se odvaja od podloge i potom se dodiruje šapa čvrstim predmetom. Fiziološki odgovor podrazumeva fleksiju prstiju i hvatanje predmeta. Slično kao i u ekvilibrijumskom testu meri se vreme potrebno za hvatanje predmeta.

Ispitivanje refleksa uspravljanja započinje postavljanjem životinje na leđa. Fiziološki odgovor podrazumeva trenutno okretanje životinje i postavljanje na ekstremitete. Tokom testa prati se vreme potrebno za okretanje životinje.

Refleks postavljanja se izvodi na iskošenoj podlozi (30°) priljubljenoj uz horizontalnu podlogu. Životinji se zadnji ekstremiteti spuste na horizontalnu podlogu, a potom se prati vreme potrebno da životinja spontano spusti prednje ekstremitete. Fiziološki odgovor je trenutno spuštanje životinje na horizontalnu podlogu.

Opšta motorna aktivnost i eksplorativno ponašanje su određivani u posebnim kavezima (55x35x30 cm), čije dno je bilo podeljeno na devet jednakih pravougaonih polja. Opšta motorna aktivnost je izražena kao broj prelazaka životinje iz jednog u drugo polje u roku od 10 minuta, dok je eksplorativno ponašanje izraženo kao broj propinjanja životinje na zadnje ekstremitete u istom periodu.

Za svaki pojedinačni test, životinja je maksimalno mogla dobiti ocenu 4. Životinja je dobijala ocenu 4, ukoliko je brzina izvođenja testa bila 75-100% kontrolne vrednosti; ocenu 3: 50-75% kontrolne vrednosti; ocenu 2: 25-50% kontrolne vrednosti; ocenu 1: 1-25% kontrolne vrednosti, a ocenom 0 ocenjivane su životinje koje nisu pokazivale nikakav

odgovor na testu. Kontrolna vrednost predstavlja brzinu izvođenja svakog pojedinačnog testa životinja iz kontrolne grupe.

Ukupna ocena na bihevioralnim testovima (OBT) je izražena kao zbir ocena svih pojedinačnih testova (maksimalna ukupna ocena = 40; minimalna ukupna ocena = 0) (204).

3.4. Analiza EEG-a

U cilju registrovanja EEG-a, pacovima su u ketaminskoj anesteziji (100 mg/kg i.p.) implantirane tri pozlaćene elektrode u frontalni, parijetalni i okcipitalni korteks stereotaksičnom metodom. Životinje su ostavljene da se oporave 7 dana nakon implantacije. EEG je registrovan pomoću 8-kanalnog aparata (RIZ, Zagreb, Hrvatska), a signali su digitalizovani korišćenjem SCB-68 kartice za prikupljanje podataka (National Instruments Co, Austin, Teksas, SAD). Frekvencija uzorkovanja od 512 Hz po kanalu i 16-bitni A/D su korišćeni za konverziju EEG signala. Granična frekvencija za EEG-snimke je postavljena na 0,3 Hz i 100 Hz za visokopropusne (high-pass) i niskopropusne (low-pass) filtere, redom. Prikupljanje podataka i obrada signala izvršeni su pomoću LabVIEW softvera, koji je razvijen u laboratoriji NeuroSciLaBG (205,206). EEG zapis je analiziran svakih 30 minuta u periodu 22-24 h posle primene poslednje doze TAA (u vremenskim tačkama 22,5, 23 i 23,5 h). Za svaki vremenski interval kada je EEG bio analiziran, deo snimka bez artefakta je bio podeljen u 8 epoha od kojih svaka traje 12 s, prema modifikovanoj metodi po Amodio i sar (21). Srednja i relativna spektralna snaga su izračunate pomoću posebnog softvera, korišćenjem brze Furijeove transformacije. Srednja spektralna snaga odražava srednju voltažu EEG talasa, kako ukupnu, tako i u određenim frekventnim opsezima (delta, 0,5-3 Hz; teta, 4-7 Hz; alfa, 8-13 Hz; beta, 14-30 Hz) i izražena je u $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$. Relativna spektralna snaga predstavlja procentualnu zastupljenost pojedinih frekventnih opsega u ukupnoj spektralnoj snazi. Na osnovu spektralne analize EEG promene su gradirane prema Amodio i sar. (0-srednja dominantna frekvencija > 7.3 Hz i relativna zastupljenost θ talasa $< 35\%$; 1-srednja dominantna frekvencija > 7.3 Hz i relativna zastupljenost θ talasa $\geq 35\%$; 2-srednja dominantna frekvencija ≤ 7.3 Hz i relativna zastupljenost δ talasa $< 45\%$; 3-srednja dominantna frekvencija ≤ 7.3 Hz i relativna zastupljenost δ talasa $\geq 45\%$) (17).

Po završetku snimanja, životinje su bile vraćene u svoj kavez.

3.5. Parametri oksidacijskog stresa i aktivnost acetilholinesteraze

Za određivanje uticaja TAA na lipidnu peroksidaciju i aktivnost katalaze glave životinja (po 6 iz svake grupe) su trenutno zamrzavane u tečnom azotu i čuvane na -85°C . Nakon izolacije moždani korteks, hipokampus i možano stablo su homogenizovani u rastvoru koji sadrži 0,05 M natrijum fosfatni pufer (pH 7,0) i 0,04 mM etilendiaminotetrasirćetnu kiselinu (EDTA) na temperaturi od 4°C (konačna koncentracija 2 mg tkiva/mL).

Stepen lipidne peroksidacije je procenjen određivanjem nivoa malondialdehida (MDA) u moždanim strukturama u reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) metodom po Aruomi i sar (207). U 0,5 mL tkivnog homogenata je dodat 0,05 M rastvor NaOH i 0,5 mL HCl (25% rastvor) i potom je sadržaj zagrevan u ključaloj vodi 10 min. Nakon hlađenja homogen je ekstrahovan u 3 mL n-butanola i centrifugiran na $2000\times g$ 10 min u cilju izdvajanja organske faze. Apsorbancija organske faze je merena spektrofotometrijski na 532 nm. Nivo MDA je određen na osnovu standardne krive 1,1,3,3-tetrametoksiopropana i izražen u nmol/mg proteina. Koncentracija ukupnih proteina je određena Lorigevom (Lowry) metodom koristeći goveđe serumske albumine kao standard (208).

Aktivnost katalaze je određena na osnovu brzine razgradnje H_2O_2 (209). U kvarcnu kivetu sa 2,975 mL 0,05 M rastvorom natrijum fosfatnog pufera (pH 7,0) i 0,4 mM rastvorom EDTA dodato je 50 μL tkivnog homogenata. Nakon pripreme u smešu je dodato 25 μL H_2O_2 i aktivnost katalaze je merena spektrofotometrijski na osnovu brzine promene apsorbancije (razgradnja H_2O_2) tokom 3 min na 240 nm. Aktivnost katalaze je izražena u U/mg proteina, pri čemu jednoj jedinici (U) odgovara aktivnost koja razgradi 1 μmol H_2O_2 /min.

Za ispitivanje uticaja FIN na oksidacijski stres u mozgu izazvan TAA-om, glave životinja (po 6 iz svake grupe) su trenutno zamrzavane u tečnom azotu a zatim čuvane na -85°C . Moždane strukture (korteks, hipokampus, talamus i *nc.caudatus*) su preparisane na hladno i homogenizovane u hladnom puferisanom saharoznom medijumu (0,25 M saharoze, 10 mmol/L K/NaPO₄ pufer pH 7.0 i 1 mmol/L EDTA) nakon čega je izdvojena

neprečišćena sinaptozomalna frakcija po metodi Whittakera i Barkera (210). Homogenizacijom usitnjeno tkivo je potom centrifugirano na 1000xg 15 min. Supernatanti su centrifugirani 30 minuta na 20000xg. Ovako dobijeni supernatant predstavlja neprečišćenu sinaptozomalnu frakciju koja sadrži membranske vezikule (mikrozome) nastale od glatkog i granulisanog endoplazmatskog retikuluma, Goldžijevog aparata i plazma membrane kao i sve solubilne komponente citoplazme. Talog je resuspendovan u dejonizovanoj vodi i ostavljen 60 minuta na +4°C uz povremeno mešanje. Ovako resuspendovan talog je zatim centrifugiran na 1700xg 15 minuta. Dobijeni supernatant predstavlja neprečišćenu mitohondrijsku frakciju i sadrži mitohondrije, lizosome i peroksizome. Neprečišćena sinaptozomalna frakcija se čuva na -80 °C. U uzorcima neprečišćene sinaptozomalne frakcije su spektrofotometrijskom metodom određivani lipidna peroksidacija, nivo redukovanog glutaciona (GSH), aktivnost superoksid dizmutaze (SOD), glutation peroksidaze (GPx), glutation reduktaze (GR), katalaze i acetilholinesteraze (AChE).

Stepen lipidne peroksidacije je određen merenjem koncentracije malondialdehida (MDA) u sinaptozomalnoj frakciji pojedinih struktura mozga (211). Tiobarbituratna kiselina (TBA) reaguje sa MDA stvarajući žuto obojeni kompleks. Količina stvorenog MDA meri se spektrofotometrijski na 533 nm.

Sadržaj GSH određivan je spektrofotometrijski upotrebom 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoeve kiseline (DTNB). DTNB reaguje sa alifatičnim tiol jedinjenjima pri pH 8,0 stvarajući p-nitrofenol anjon žute boje (212). Intenzitet boje se koristi za merenje koncentracije GSH očitavanjem na spektrofotometru pri 412 nm.

Aktivnost glutation peroksidaze (GPx) je određena na osnovu oksidacije redukovanog glutaciona (GSH) sa iskorišćavanjem NADPH u reakciji koju katalizuje enzim glutation reduktaza. Meru aktivnosti glutation peroksidaze u kuplovanoj reakciji sa glutation reduktazom, predstavlja promena ekstinkcije merena na 340 nm kao posledica potrošnje $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (213).

Aktivnost glutation reduktaze (GR) je određena po metodi Carlberga i Mannervika (214). Metoda se zasniva na reakciji oksidovanog glutaciona sa NADPH u prisustvu GR iz

uzorka. Potrošnja NADPH je proporcionalna aktivnosti GR i prati se spektrofotometrijski na 340 nm.

Aktivnost SOD je određena kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u baznoj sredini (215). Aktivnost ukupne SOD određuje se kinetički, kao promena ekstinkcije u vremenu (5 min) na talasnoj dužini od 480 nm.

Katalaza razlaže vodonik peroksid na vodu i molekularni kiseonik. Aktivnost katalaze je određena na osnovu količine nerazloženog vodonik peroksida (supstrata), koji sa amonijum molibdatom gradi žuto obojeno kompleksno jedinjenje. Intenzitet žute boje se određuje spektrofotometrijski na 405 nm (216).

Aktivnost acetilholinesteraze je određena na osnovu brzine razlaganja acetilholin jodida. Produkt razlaganja acetilholin jodida se vezuje za DTNB gradeći žuto obojeni kompleks, čija se količina meri spektrofotometrijski na 412 nm (217).

3.6. Western blot analiza

Za *Western blot* analizu životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom i dekapitacijom bez anestezije, nakon čega su glave trenutno zamrzavane u tečnom azotu i čuvane na -85°C . Dva moždana regiona, dorzolateralni frontalni korteks i hipokampus, su izolovana i homogenizovana 30 minuta na ledu u litičkom puferu (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 1 mM fenilmetilsulfonil fluorid (Sigma-Aldrich, P7626), koktel inhibitora proteaza (Sigma-Aldrich, P8340), 200mM natrijum ortovanadat (Sigma, Germany) and 1M NaF (Merck, USA)). Nakon homogenizacije uzorci su centrifugirani na 14000xg 15 minuta na 4°C i izdvojeni su supernatanti kao ćelijski lizati. U supernatantima je određena koncentracija proteina korišćenjem goveđeg albumina kao standard (218). Jednake količine proteina (50 μg) iz svakog uzorka su prenete na 10% i 12% SDS poliakrilamidni gel i razdvojene elektroforezom. Nakon transfera proteina sa gela na nitroceluloznu membranu, membrane su nespecifično blokirane 1 h 5% nemasnim mlekom u prahu u Tris puferisanom NaCl/0,1% Tween 20 (TBST) i potom inkubirane sa primarnim antitelom preko noći. Primarna antitela korišćena u ovoj studiji su: poliklonsko kozje anti-SOD1 (1:500), poliklonsko kozje anti-SOD2 (1:500), poliklonsko zečje anti-p67-phox (1:500), poliklonsko zečje anti-p47-phox (1:500), poliklonsko zečje anti-p40-phox

(1:500), poliklonsko zečje anti-p22-phox (1:500), monoklonsko mišje anti-NeuN (1:1000), poliklonsko zečje anti-GFAP (1:2000), poliklonsko ovčije anti-Iba1 (1:250) i monoklonsko mišje anti-MOG antitelo (1:1000). Membrane su potom inkubirane sa sekundarnim anti-mišjim (1:2000), anti-zečjim (1:2000), anti-kozjim (1:2000) i anti-ovčijim antitelima (1:2000) obeleženim peroksidazom rena u TBST 1 h na sobnoj temperaturi. Posle svakog koraka membrane su ispirane 0,1% TBST-om. Po završenoj inkubaciji membrane su isprane od antitela i inkubirane sa mišjim monoklonskim antitelima na aktin (1:10000) u cilju dokazivanja jednakih količina proteina u svim ispitivanim uzorcima. U foto-komori, rendgen film će biti izložen membrani koja je tretirana sa *Enhanced Chemiluminescence System* (ECS) i razvijen. Blotovi će biti skenirani i semikvantitativna denzitometrijska analiza će biti vršena korišćenjem programa *ImageQuant 5.2*.

3.7. Statistička analiza

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška, dok su ukupne OBT izražene u medijanama sa 25. i 75. percentilom u zagradi. Statistička značajnost razlika u koncentraciji amonijaka i rektalnoj temperaturi između grupa je procenjena jednostrukom analizom varijanse (ANOVA) sa Fišerovim (Fisher) *post hoc* testom. Za poređenje ukupne OBT korišćen je Fridmanov (Friedman) neparametarski test, dok je za poređenje opšte motorne aktivnosti i eksplorativnog ponašanja korišćena dvostruka ANOVA sa Takijevim (Tuckey) *post hoc* testom. Značajnost razlike u izvođenju ostalih bihejvioralnih testova je procenjena hi-kvadrat testom. Kako je Kolmogorov-Smirnovljev testom utvrđena normalna raspodela spektralnih snaga u svim uzorcima, statistička značajnost razlika u apsolutnoj i relativnoj spektralnoj snazi je procenjena dvostrukom analizom varijanse (ANOVA) sa Tuckeyevim *post hoc* testom. Za procenu statističke značajnosti razlika u parametrima oksidacijskog stresa, aktivnosti acetilholinesteraze i ekspresiji proteina dobijenih Western blot metodom korišćena je jednostruka ANOVA sa Fisherovim *post hoc* testom. Statistička analiza vršena je kompjuterskim programom SPSS15.0, a razlika je smatrana statistički značajnom, ako je $p < 0,05$.

4.REZULTATI

4.1. Uticaj TAA na ponašanje, EEG i parametre oksidacijskog stresa u mozgu

Sve životinje su preživele 24 h nakon primene TAA u dozi od 300 mg/kg. Letalitet u TAA₆₀₀ grupi je bio 10% (1/10), a u TAA₉₀₀ grupi 50% (9/18).

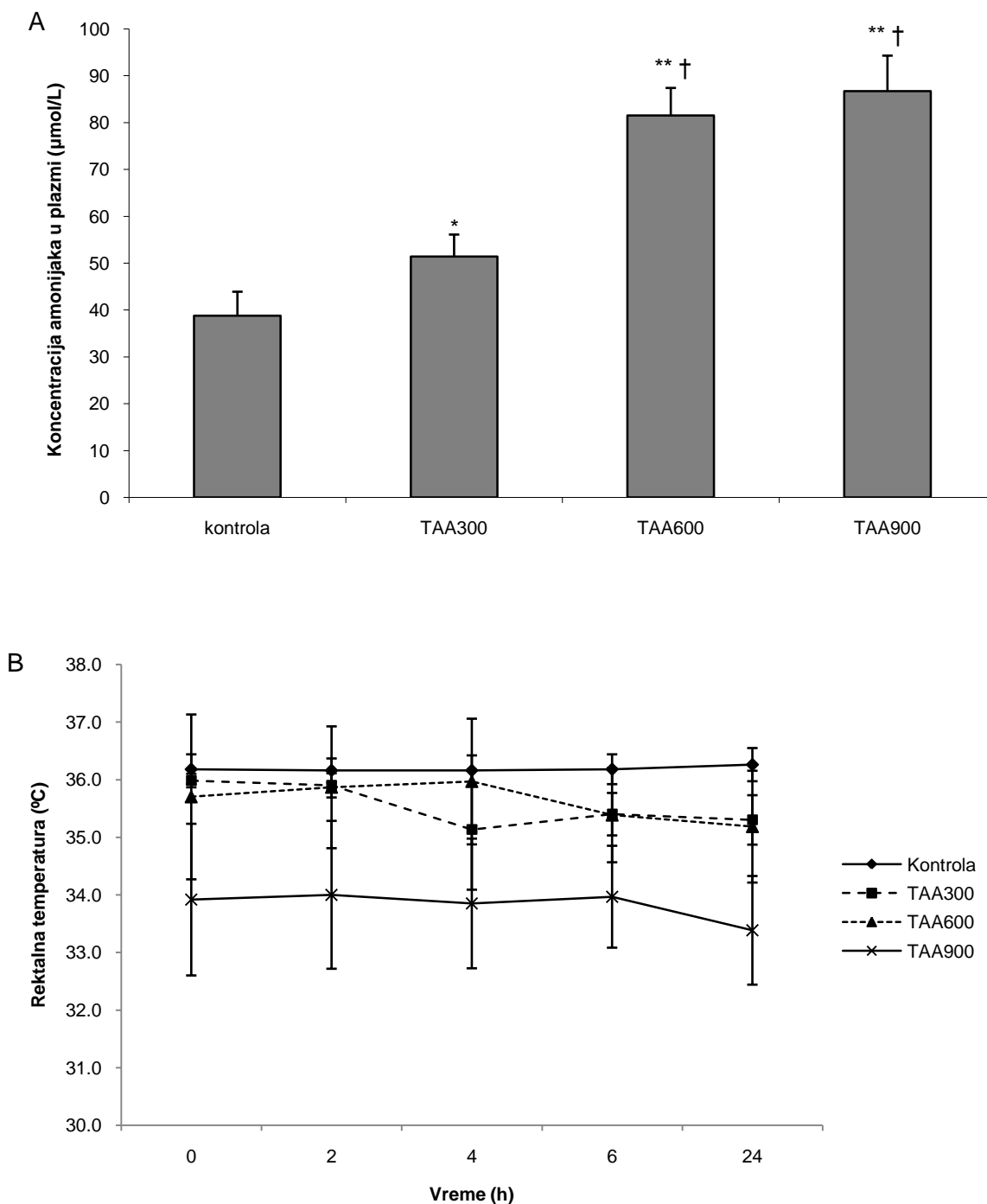
Rezultati studije su pokazali da koncentracija amonijaka u plazmi bila značajno viša u svim TAA grupama u poređenju sa kontrolom ($38,8 \pm 5,1 \mu\text{mol/L}$). Takođe, koncentracija amonijaka je bila značajno viša u TAA₆₀₀ ($81,5 \pm 5,9 \mu\text{mol/L}$) i TAA₉₀₀ grupi ($86,7 \pm 7,6 \mu\text{mol/L}$) u odnosu na TAA₃₀₀ grupu ($51,4 \pm 4,7 \mu\text{mol/L}$) ($p < 0.01$). Nije uočena značajna razlika u koncentraciji amonijaka između TAA₆₀₀ i TAA₉₀₀ grupe (Grafikon 4.1A).

Iako je rektalna temperatura bila niža u grupama tretiranim TAA-om u poređenju sa kontrolom u svim vremenskim tačkama, ova razlika nije bila statistički značajna ($p > 0,05$; Grafikon 4.1B).

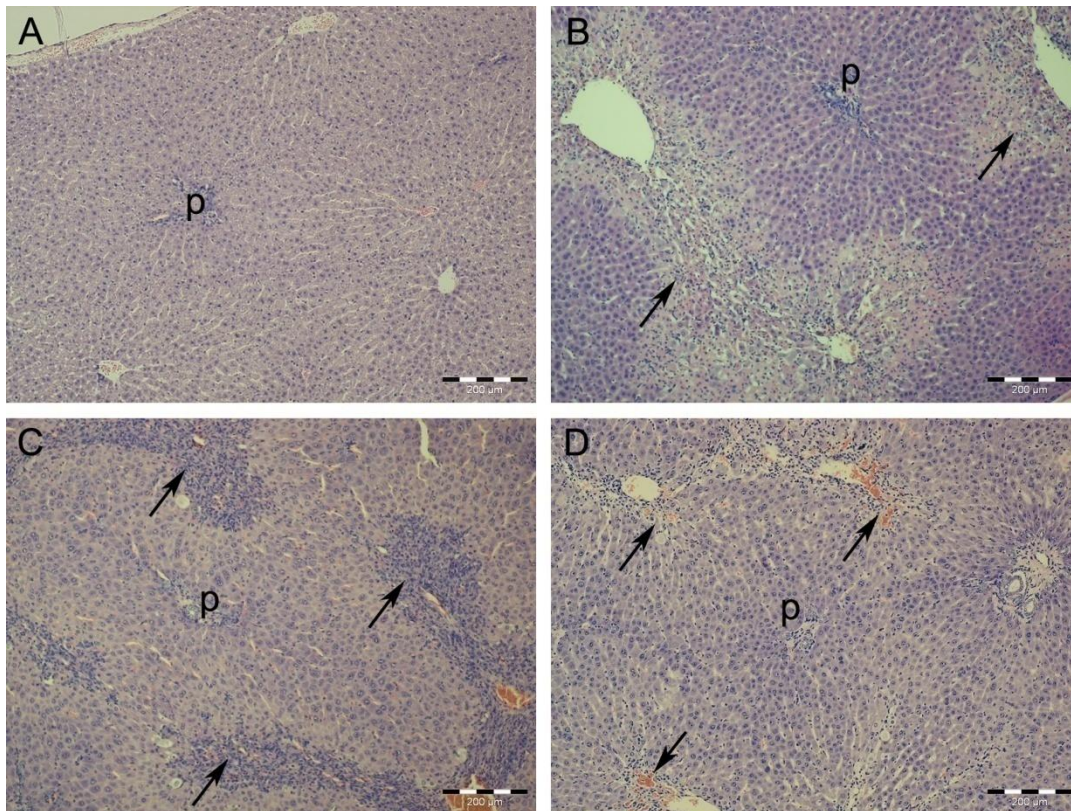
4.1.1. Histološka analiza

U kontrolnoj grupi nisu uočene nikakve patohistološke promene u jetri (Slika 4.1A). Nasuprot ovome, u TAA₃₀₀ grupi uočena je akutna premošćavajuća (*engl.* bridging) centralna nekroza sa izraženijom eozinofilijom hepatocita i pojedinačnim apoptotskim telašcima (u proseku 2,5 na 1000 ćelija) 24 h nakon primene TAA. Portni prostori su normalne građe (Slika 4.1B).

Akutna premošćavajuća nekroza bez vidljivih apoptotskih telašaca je uočena u TAA₆₀₀ grupi 24 h nakon primene poslednje doze TAA (Slika 4.1C). Slično kao u TAA₆₀₀ grupi premošćavajuća nekroza je bila prisutna na svim isečcima jetre u TAA₉₀₀ grupi, praćena zapaljenjskim infiltratom i fokalnim krvarenjem u nekrotičnim zonama. Apoptotska telašca nisu bila primetna u jetri u TAA₉₀₀ grupi, ali se mogu uočiti mitoze (Slika 4.1D).



Grafikon 4.1. Uticaj tioacetamida (TAA) na koncentraciju amonijaka u plazmi (A) i rektalnu temperaturu pacova (B). Dnevne doze TAA (300 mg/kg) su administrirane intraperitonealno tokom jednog (TAA₃₀₀), dva (TAA₆₀₀) ili tri uzastopna dana (TAA₉₀₀). Rektalna temperatura je merena 0, 2, 4, 6 i 24 h nakon primene poslednje doze TAA, dok je krv za određivanje koncentracije amonijaka uzeta iz desne polovine srca 24 h nakon primene poslednje doze TAA. Statistička značajnost razlike u koncentraciji amonijaka je procenjena primenom jednostruke ANOVE sa Fišerovim (Fisher) *post hoc* testom, dok je značajnost razlike u rektalnoj temperaturi procenjena primenom dvostruke ANOVE sa Takijevim (Tuckey) *post hoc* testom (**p*<0,05 i ***p*<0,01 u odnosu na kontrolu, †*p*<0,01 u odnosu na TAA₃₀₀ grupu).



Slika 4.1. Patohistološke promene u jetri nakon intraperitonealne primene tioacetamida (TAA) (H&E bojenje).

- A. Jetra kontrolnih životinja tretiranih fiziološkim rastvorom je normalne građe.
- B. Jetra pacova iz TAA₃₀₀ grupe 24 h nakon primene TAA sa premošćavajućom (*engl. bridging*) centro-centralnom nekrozom, pojačanom eozinofilijom hepatocita, prisustvom pojedinačnih apoptotskih telašaca i očuvanim portnim prostorima.
- C. Jetra pacova iz TAA₆₀₀ grupe 24 h nakon primene druge doze TAA sa akutnom premošćavajućom nekrozom i očuvanim portnim prostorima
- D. Jetra pacova iz TAA₉₀₀ grupe 24 h nakon primene treće doze TAA sa akutnom premošćavajućom nekrozom, mestimičnim zapaljenjskim infiltratom i fokalnim krvarenjem u nekrotičnim zonama (p-portni prostor, strelica-nekroza)

4.1.2. Bihevioralni testovi

Ukupna OBT u TAA₃₀₀ grupi se nije značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu grupu u svim vremenskim tačkama (Tabela 4.1). S druge strane, ukupna OBT je bila značajno niža u TAA₆₀₀ i TAA₉₀₀ grupi u poređenju sa kontrolom u svim intervalima kada su izvođeni testovi ($p < 0,01$). Takođe, ukupna OBT je bila značajno niža u TAA₉₀₀ u odnosu na TAA₆₀₀ grupu i najniža ukupna OBT je uočena u TAA₉₀₀ grupi 24 h nakon tretmana.

Tabela 4.1. Uticaj tioacetamida (TAA) na ukupnu ocenu eksperimentalnih životinja na bihevioralnim testovima (OBT).

| Vreme (h) | Ukupna ocena na bihevioralnim testovima (OBT) | | | |
|-----------|---|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Kontrola | TAA ₃₀₀ | TAA ₆₀₀ | TAA ₉₀₀ |
| 0 | 40 (40,40) | 40 (40, 40) | 38 (38, 40) | 15 (1, 22)** |
| 2 | 40 (40,40) | 40 (40, 40) | 31 (27, 36)** | 10 (1, 20)** # |
| 4 | 40 (40,40) | 40 (38, 40) | 32 (32, 38)** | 10 (1, 17)** # |
| 6 | 40 (40,40) | 40 (38, 40) | 31 (27, 38)** | 10 (1, 17)** # |
| 24 | 40 (40,40) | 40 (37, 40) | 32 (29, 35)** | 4 (0, 4)** # |

Dnevne doze TAA (300 mg/kg) su administrirane intraperitonealno tokom jednog (TAA₃₀₀), dva (TAA₆₀₀) ili tri uzastopna dana (TAA₉₀₀).

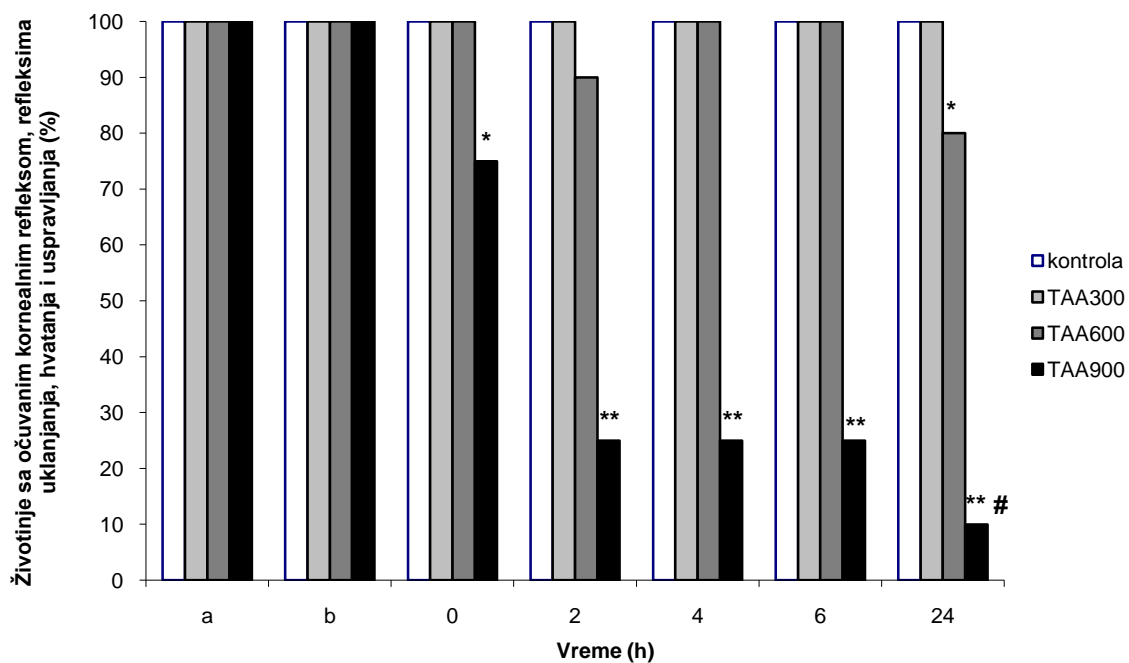
Bihevioralni testovi su vršeni 0, 2, 4, 6 i 24 h nakon primene poslednje doze TAA. Na svakom testu životinja je mogla dobiti maksimalnu ocenu 4 (ocena 4, ako je brzina izvođenja testa 75-100% kontrolnih vrednosti; ocena 3, 50-75% kontrolnih vrednosti; ocena 2, 25-50% kontrolnih vrednosti; ocena 1, 1-25% kontrolnih vrednosti, ocena 0 ukoliko životinja ne izvodi test). Ukupna OBT je izračunata kao zbir ocena dobijenim na pojedinačnim bihevioralnim testovima.

Rezultati su prikazani kao medijane sa 25. i 75. percentilom u zagradi. Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena Fridmanovim (Friedman) neparametarskim testom (** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,01$ u odnosu na TAA₆₀₀ grupu).

Analiza pojedinačnih testova je pokazala da su vitalni refleksi (kornealni refleks, refleksi uklanjaња, hvatanja i uspravljanja) bili očuvani kod svih životinja iz TAA₃₀₀ grupe u periodu od 24 h od tretmana. Međutim, u TAA₆₀₀ grupi ovi refleksi su bili značajno sniženi (očuvani u 80% životinja) u odnosu na kontrolu (očuvani u 100% životinja) 24 h nakon primene druge doze TAA ($p < 0,05$). Nasuprot ovome, vitalni refleksi su bili značajno sniženi u TAA₉₀₀ grupi (očuvani u 25% životinja) u poređenju sa kontrolom već 2 h nakon tretmana ($p < 0,01$). Tokom vremena ovi refleksi su pokazalo dodatno smanjenje i 24 h nakon tretmana oni su bili očuvani u 10% životinja iz TAA₉₀₀ grupe (Grafikon 4.2).

Refleksni trzaji glave, auditivni refleks, ekvilibrijumski test i refleks postavljanja su bili značajno oslabljeni u TAA₆₀₀ grupi u poređenju sa kontrolom u svim vremenskim tačkama ($p < 0,01$), dok su ovi refleksi bili najslabiji u TAA₉₀₀ grupi. Ovi refleksi su bili ugašeni kod svih životinja iz TAA₉₀₀ grupe 24 h nakon primene poslednje doze TAA (Grafikon 4.3A i 4.3B).

Opšta motorna aktivnost i eksplorativno ponašanje su bili značajno niži u TAA₆₀₀ grupi u poređenju sa kontrolom u svim vremenskim tačkama ($p < 0,01$). Sa porastom doze TAA je izazvao izraženiji pad motorne aktivnosti i eksplorativnog ponašanja i u TAA₉₀₀ grupi ovi testovi su bili značajno niži u odnosu na TAA₆₀₀ grupu ($p < 0,01$). Motorna aktivnost je bila odsutna 24 h nakon tretmana u TAA₉₀₀ grupi, dok eksplorativno ponašanje (propinjanje na zadnje noge) nije bilo uočljivo 4 h nakon primene poslednje doze TAA. Nije uočena značajna razlika u motornoj i eksplorativnoj aktivnosti između TAA₃₀₀ i kontrolne grupe u periodu od 24 h nakon tretmana (Grafikon 4.4A i 4.4B).



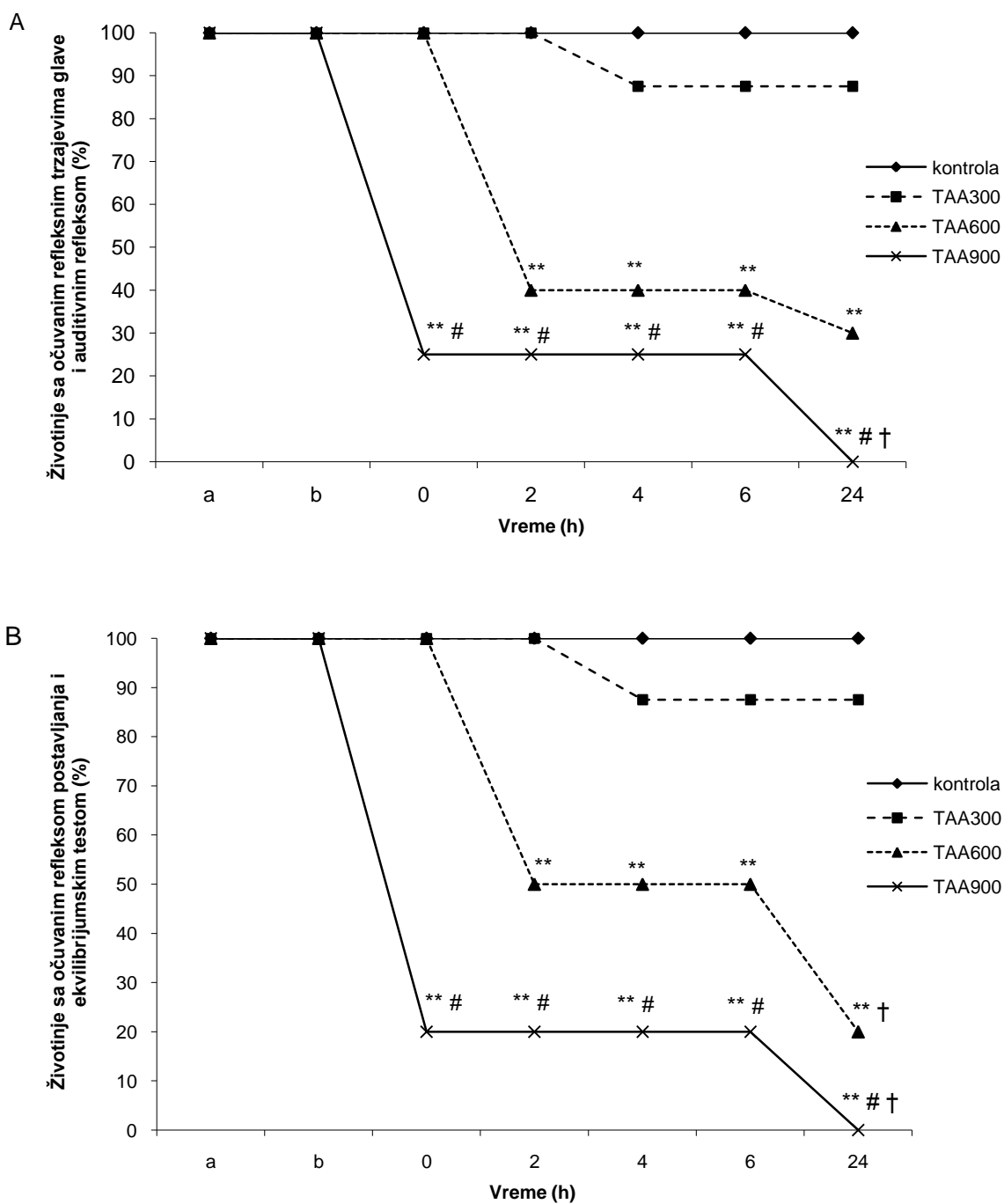
Grafikon 4.2. Uticaj tioacetamida (TAA) na vitalne reflekse (kornealni refleks, refleks uklanjanja, hvatanja i uspravljanja) eksperimentalnih životinja. Dnevne doze TAA (300 mg/kg) su administrirane intraperitonealno tokom jednog (TAA₃₀₀), dva (TAA₆₀₀) ili tri uzastopna dana (TAA₉₀₀). Vitalni refleksi su ispitivani 0, 2, 4, 6 i 24 h nakon primene poslednje doze TAA.

a-trenutak ubrizgavanja prve doze TAA (300 mg/kg) u TAA₉₀₀ grupi (48 h pre izvođenja testova)

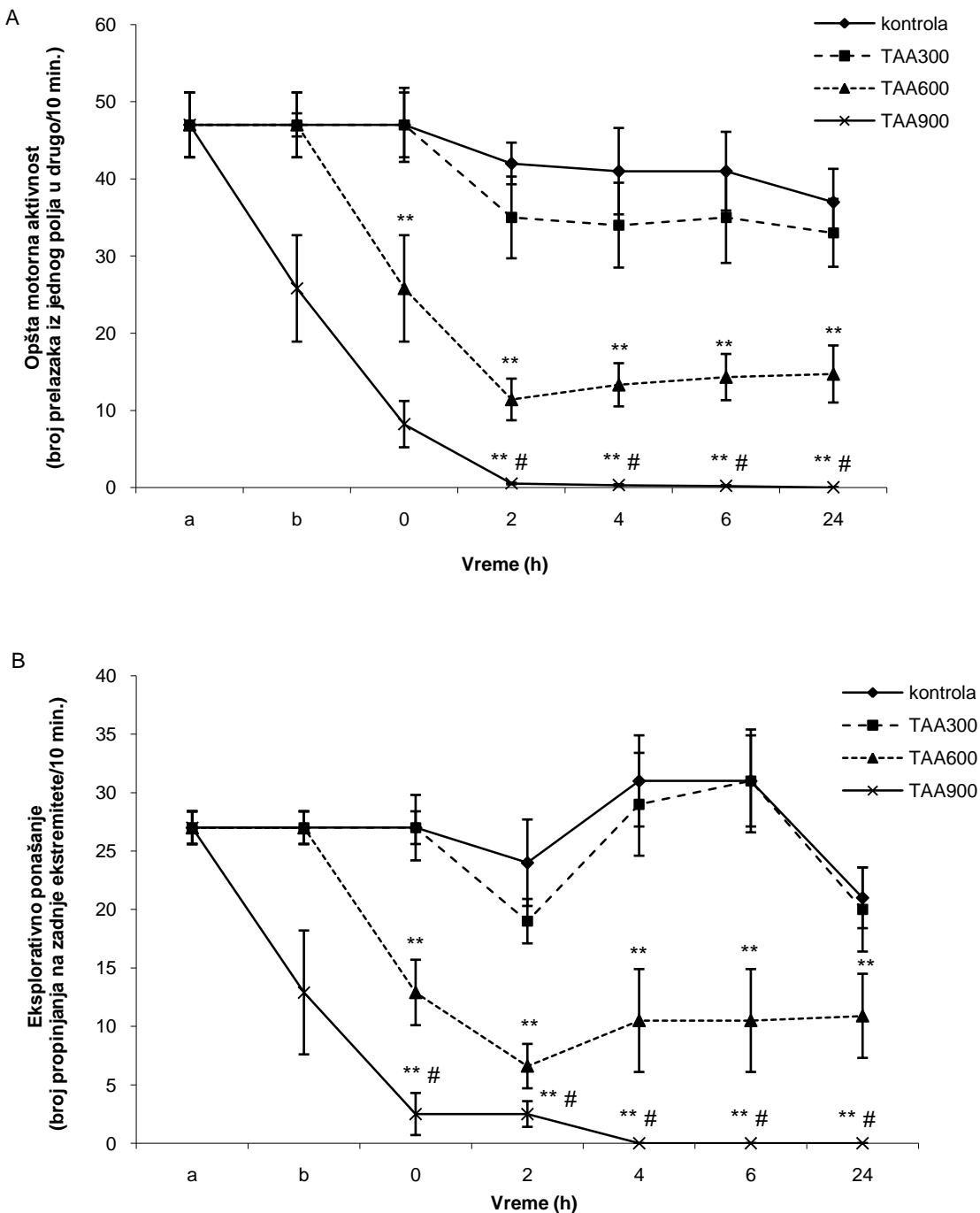
b-trenutak ubrizgavanja prve doze TAA (300 mg/kg) u TAA₆₀₀ grupi (24 h pre izvođenja testova)

0-trenutak ubrizgavanja jedine doze TAA (300 mg/kg) u TAA₃₀₀ grupi (neposredno pre izvođenja testova)

Statistička značajnost razlike je procenjena korišćenjem hi-kvadrat testa (* p<0,05 i **p<0,01 u odnosu na kontrolu, #p<0,01 u odnosu na TAA₆₀₀ grupu).



Grafikon 4.3. Uticaj tioacetamida (TAA) na auditivni refleks, refleksne trzaje glave (A), refleks postavljanja i ekvilibrirajumski test (B) eksperimentalnih životinja. Statistička značajnost razlike je procenjena korišćenjem hi-kvadrat testa (** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,01$ u odnosu na TAA₆₀₀ grupu, † $p < 0,01$ u odnosu na istu grupu u prethodnoj vremenskoj tački).
 Za detaljnije informacije videti grafikon 4.2.



Grafikon 4.4. Uticaj tioacetamida (TAA) na opštu motornu aktivnost (A) i eksplorativno ponašanje (B). Opšta motorna aktivnost je izražena kao broj prelazaka životinje iz jednog polja u drugo u periodu od 10 min, dok je eksplorativno ponašanje izraženo kao broj propinjanja životinje na zadnje ekstremitete u istom periodu. Statistička značajnost razlike je procenjena korišćenjem dvostruke ANOVE sa Takijevim (Tuckey) *post hoc* testom (** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,01$ u odnosu na TAA₆₀₀ grupu). Za detaljnije informacije videti grafikon 4.2.

4.1.3. Analiza EEG-a

Srednja ukupna spektralna snaga je bila značajno viša u TAA₃₀₀ ($1856,58 \pm 644,17 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$) ($p < 0,01$) i TAA₆₀₀ grupi ($1907,62 \pm 623,83 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$) ($p < 0,01$) u poređenju sa kontrolom ($180,63 \pm 66,45 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$) 23,5 h nakon tretmana. U ostalim vremenskim tačkama kada je EEG analiziran nije uočena značajna razlika u srednjoj ukupnoj spektralnoj snazi između TAA₃₀₀, TAA₆₀₀ i kontrolne grupe ($p > 0,05$). S druge strane, srednja ukupna spektralna snaga je bila značajno niža u TAA₉₀₀ grupi u odnosu na kontrolu u periodu od 22,5-23,5 h nakon tretmana (Grafikon 4.5A).

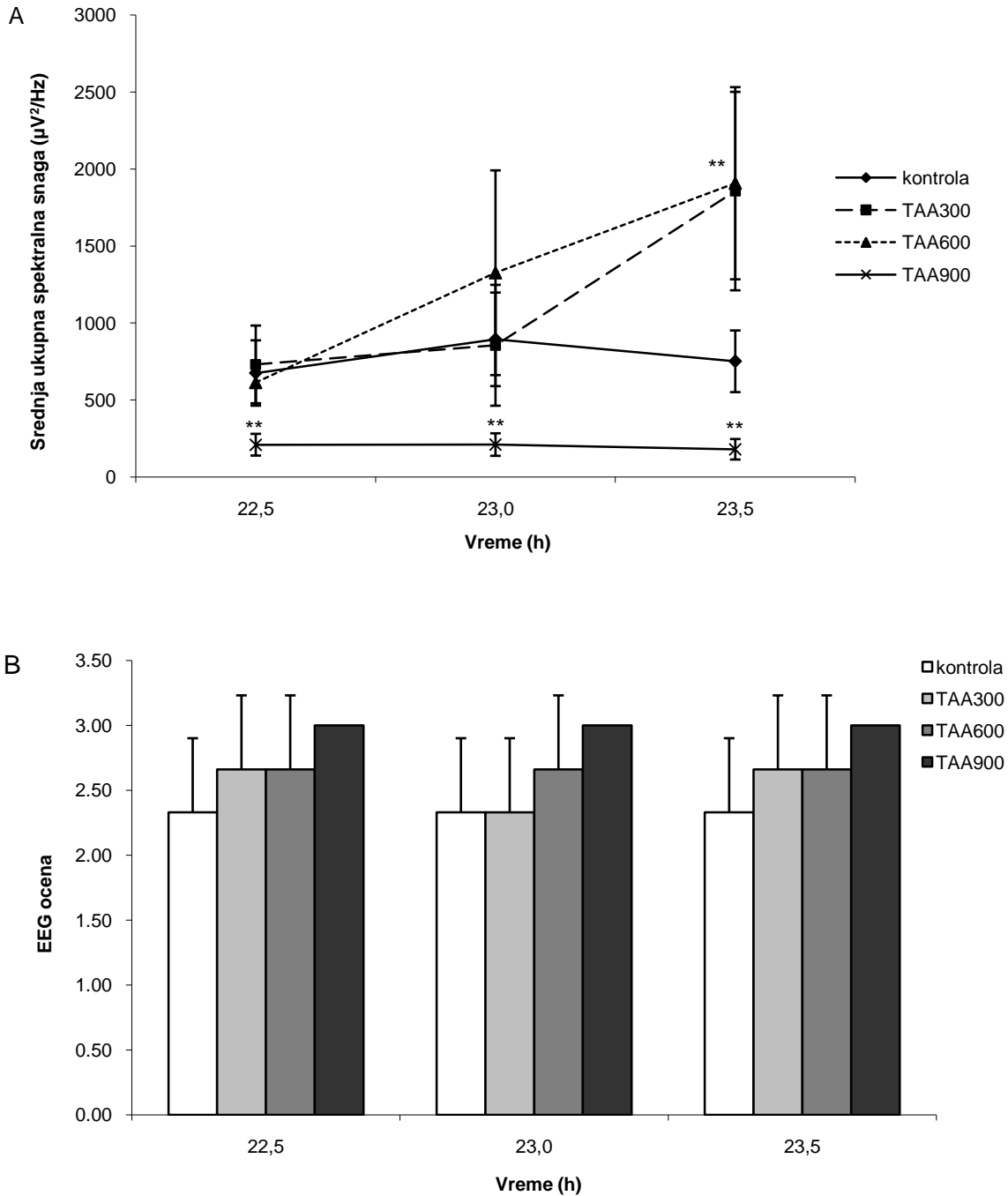
EEG promene u TAA₉₀₀ grupi u svim vremenskim tačkama odgovaraju oceni 3 (srednja dominantna frekvencija $\leq 7,3$ Hz i zastupljenost δ talasa $\geq 45\%$). Međutim, nije uočena statistički značajna razlika u EEG oceni između grupa tretiranih TAA-om i kontrole (Grafikon 4.5B).

Analizom srednjih spektralnih snaga po pojedinim frekventnim opsezima naša studija je pokazala da je srednja spektralna snaga beta talasa bila značajno viša u TAA₃₀₀ grupi u odnosu na kontrolu u svim vremenskim tačkama. Najizraženiji porast je uočen 23,5 h nakon primene TAA. Dok je srednja spektralna snaga beta talasa bila značajno viša u TAA₆₀₀ grupi u odnosu na kontrolu 23 h ($p < 0,05$) i 23,5 h nakon tretmana ($p < 0,01$), nije uočena značajna razlika u srednjoj snazi beta talasa između TAA₉₀₀ i kontrolne grupe ($p > 0,05$; Tabela 4.2). Za razliku od srednje, relativna spektralna snaga beta talasa je bila značajno niža u TAA₃₀₀ grupi u poređenju sa kontrolom u svim vremenskim tačkama ($p < 0,01$). Nisu uočene značajne promene u relativnoj snazi beta talasa između TAA₆₀₀, TAA₉₀₀ i kontrolne grupe (Tabela 4.2).

Srednja spektralna snaga alfa talasa je bila značajno viša u TAA₃₀₀ i značajno niža u TAA₉₀₀ grupi u poređenju sa kontrolom u svim vremenskim tačkama ($p < 0,01$). U TAA₆₀₀ grupi srednja spektralna snaga alfa talasa je bila viša u odnosu na kontrolu samo 23,5 h nakon primene poslednje doze TAA (Tabela 4.3). Relativna spektralna snaga alfa talasa je bila značajno viša u TAA₃₀₀ grupi u svim vremenskim tačkama, a u TAA₆₀₀ samo 23,5 h nakon tretmana u poređenju sa kontrolnom grupom. U TAA₉₀₀ grupi nije uočena značajna razlika u relativnoj snazi alfa talasa u odnosu na kontrolu (Tabela 4.3).

Spektralna analiza je pokazala da je srednja spektralna snaga teta talasa bila značajno viša u TAA₃₀₀ i TAA₆₀₀ grupi u poređenju sa kontrolom 23,5 h nakon tretmana ($p < 0,01$). Nasuprot ovome, u TAA₉₀₀ grupi srednja spektralna snaga teta talasa je bila značajno niža u svim vremenskim tačkama u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$; Tabela 4.4). Relativna spektralna snaga teta talasa se nije značajno promenila u TAA₃₀₀ u odnosu na kontrolnu grupu. Veće doze TAA su uzrokovale značajne promene relativne spektralne snage teta talasa u poređenju sa kontrolom: porast u TAA₆₀₀ grupi 22,5 h nakon tretmana i pad u TAA₉₀₀ grupi u svim vremenskim tačkama kada je EEG analiziran (Tabela 4.4).

Dok u TAA₃₀₀ grupi nije uočena značajna razlika u srednjoj spektralnoj snazi delta talasa u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$), srednja snaga delta talasa je bila značajno viša u TAA₆₀₀ u poređenju sa kontrolnom grupom u svim vremenskim tačkama ($p < 0,01$). Istovremeno, u TAA₉₀₀ grupi je uočen značajan pad srednje spektralne snage delta talasa u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$; Tabela 4.5). Relativna spektralna snaga delta talasa je bila značajno niža u TAA₃₀₀ ($p < 0,01$) i TAA₆₀₀ grupi ($p < 0,01$) u poređenju sa kontrolom 22,5 h nakon tretmana. Ovaj pad se odžavao u TAA₃₀₀ grupi 23 i 23,5 h nakon primene poslednje doze TAA, dok se u TAA₆₀₀ grupi relativna snaga delta talasa vratila na kontrolne vrednosti. Nasuprot ovome, relativna spektralna snaga delta talasa je bila značajno viša u TAA₉₀₀ grupi u odnosu na kontrolu u svim vremenskim tačkama ($p < 0,01$; Tabela 4.5).



Grafikon 4.5. Uticaj tioacetamida (TAA) na srednju ukupnu spektralnu snagu (A) i EEG ocenu (B) pacova. EEG je registrovan u periodu od 22-24 h nakon tretmana i analiziran u intervalima od 30 minuta (u vremenskim tačkama 22,5, 23 i 23,5 h). U svakoj tački deo EEG-a bez artefakta je podeljen na 8 epoha od po 12 s i analiziran brzom Furijeovom (Fourier) transformacijom. EEG ocena je određena prema Amodio i sar. (1999) (0-srednja dominantna frekvencija > 7.3 Hz i relativna zastupljenost θ talasa < 35%; 1-srednja dominantna frekvencija > 7.3 Hz i relativna zastupljenost θ talasa \geq 35%; 2-srednja dominantna frekvencija \leq 7.3 Hz i relativna zastupljenost δ talasa < 45%; 3-srednja dominantna frekvencija \leq 7.3 Hz i relativna zastupljenost δ talasa \geq 45%). Statistička značajnost razlike srednjih ukupnih spektralnih snaga je procenjena korišćenjem dvostruke ANOVE sa Takijevim (Tuckey) *post hoc* testom, a EEG ocene Fridmanovim testom (** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu).

Tabela 4.2. Uticaj tioacetamida (TAA) na srednju i relativnu spektralnu snagu **beta** talasa (14-30 Hz).

| Vreme nakon tretmana(h) | Srednja spektralna snaga beta talasa ($\mu V^2/Hz$) | | | | Relativna spektralna snaga beta talasa (%) | | | |
|-------------------------------|---|--------------------|--------------------|--------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Kontrola | TAA ₃₀₀ | TAA ₆₀₀ | TAA ₉₀₀ | Kontrola | TAA ₃₀₀ | TAA ₆₀₀ | TAA ₉₀₀ |
| 22,5 | 23,32±6,01 | 39,81±10,17** | 26,16±7,09 | 19,87±2,65 | 8,4±1,7 | 5,4±1,1** | 7,3±0,2 | 8,9±0,3 |
| 23,0 | 23,65±6,03 | 37,15±9,52* | 38,55±11,32* | 24,12±4,45 | 8,6±1,6 | 4,4±1,1** | 7,9±1,2 | 8,5±0,1 |
| 23,5 | 23,38±5,99 | 68,14±17,03** | 61,34±13,87** | 20,38±3,41 | 9,1±0,9 | 3,7±0,4** | 8,2±1,9 | 9,4±0,5 |

EEG je registrovan u periodu od 22-24 h nakon tretmana i analiziran u intervalima od 30 minuta (u vremenskim tačkama 22,5, 23 i 23,5 h). Srednja i relativna spektralna snaga su određene pomoću posebnog softvera korišćenjem brze Furijeove (Fourier) transformacije.

Statistička značajnost razlike srednjih ukupnih spektralnih snaga je procenjena korišćenjem dvostruke ANOVE sa Takijevim (Tuckey) *post hoc* testom (*p<0,05 i **p<0,01 u odnosu na kontrolu).

Za detaljnije informacije videti grafikon 4.5.

Tabela 4.3. Uticaj tioacetamida (TAA) na srednju i relativnu spektralnu snagu **alfa** talasa (8-13 Hz).

| Vreme nakon tretmana(h) | Srednja spektralna snaga alfa talasa ($\mu\text{V}^2/\text{Hz}$) | | | | Relativna spektralna snaga alfa talasa (%) | | | |
|-------------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Kontrola | TAA ₃₀₀ | TAA ₆₀₀ | TAA ₉₀₀ | Kontrola | TAA ₃₀₀ | TAA ₆₀₀ | TAA ₉₀₀ |
| 22,5 | 80,76±25,46 | 161,05±46,73** | 82,50±24,67 | 17,32±3,46** | 11,9±1,0 | 22,0±2,9** | 14,9±2,7 | 9,7±0,5 |
| 23,0 | 85,19±26,63 | 185,02±26,94** | 131,21±43,86 | 24,07±4,13** | 9,5±0,6 | 23,9±2,6** | 9,9±1,8 | 9,2±0,8 |
| 23,5 | 79,90±22,83 | 270,73±42,21** | 277,54±59,98** | 22,75±3,49** | 10,6±2,4 | 14,6±2,0* | 14,5±1,9* | 10,9±1,9 |

Statistička značajnost razlike srednjih ukupnih spektralnih snaga je procenjena korišćenjem dvostruke ANOVE sa Takijevim (Tuckey) *post hoc* testom (*p<0,05 i **p<0,01 u odnosu na kontrolu).

Za detaljnije informacije videti grafikon 4.5.

Tabela 4.4. Uticaj tioacetamida (TAA) na srednju i relativnu spektralnu snagu **teta** talasa (4-7 Hz).

| Vreme nakon tretmana(h) | Srednja spektralna snaga teta talasa ($\mu\text{V}^2/\text{Hz}$) | | | | Relativna spektralna snaga teta talasa (%) | | | |
|-------------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Kontrola | TAA ₃₀₀ | TAA ₆₀₀ | TAA ₉₀₀ | Kontrola | TAA ₃₀₀ | TAA ₆₀₀ | TAA ₉₀₀ |
| 22,5 | 124,22±34,39 | 138,73±20,75 | 95,32±11,49 | 28,17±7,11** | 18,3±0,8 | 18,9±1,3 | 26,5±1,9** | 7,1±0,2** |
| 23,0 | 134,39±41,24 | 93,60±28,10 | 184,66±85,80 | 30,32±6,24** | 15,0±2,1 | 18,3±1,9 | 16,2±2,8 | 5,8±1,2** |
| 23,5 | 140,81±37,46 | 308,37±25,17** | 363,71±34,03** | 29,86±6,99** | 18,7±2,0 | 16,6±1,9 | 19,1±2,6 | 6,1±1,0** |

Statistička značajnost razlike srednjih ukupnih spektralnih snaga je procenjena korišćenjem dvostruke ANOVE sa Takijevim (Tuckey) *post hoc* testom (**p<0,01 u odnosu na kontrolu).

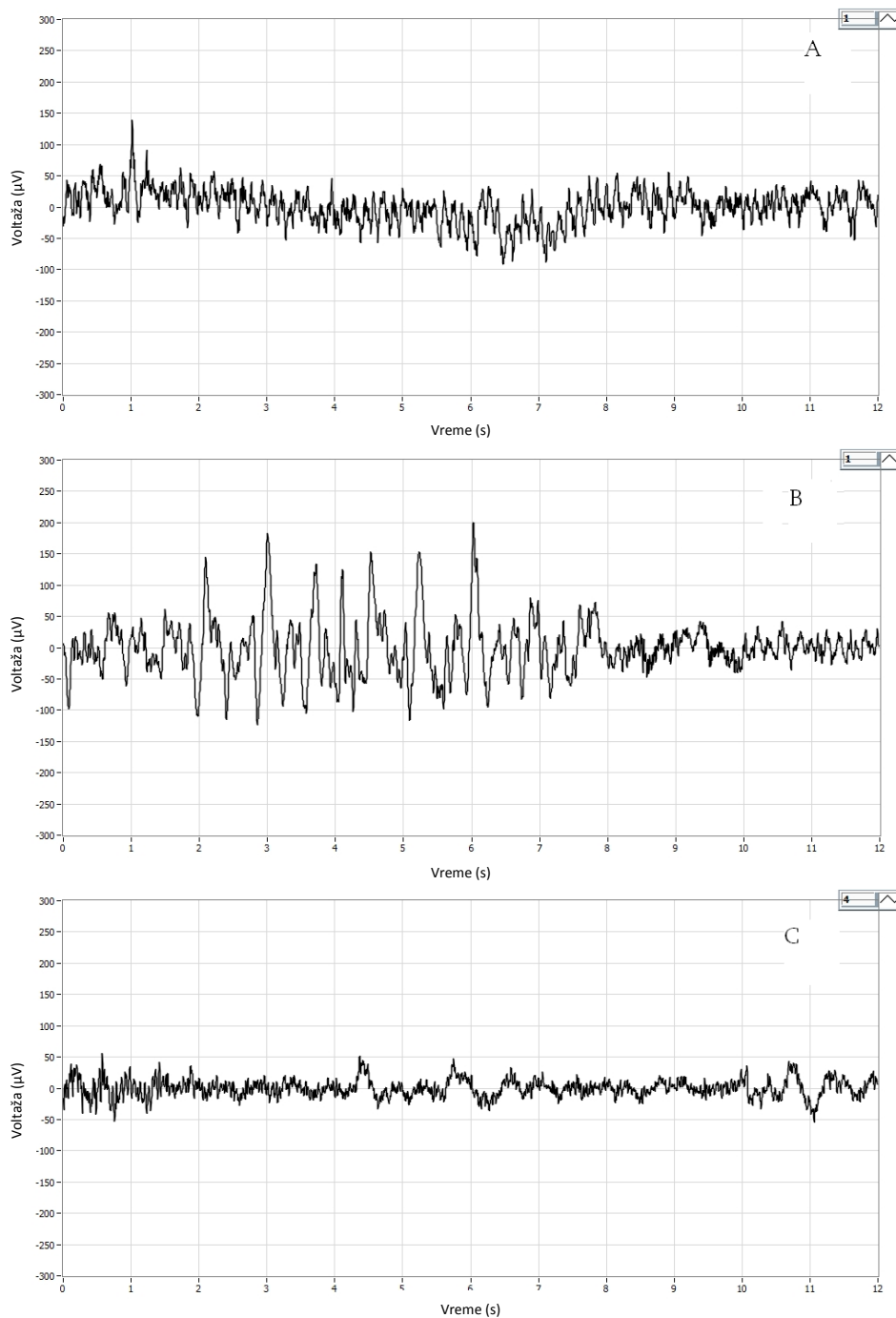
Za detaljnije informacije videti grafikon 4.5.

Tabela 4.5. Uticaj tioacetamida (TAA) na srednju i relativnu spektralnu snagu **delta** talasa (0,5-3 Hz).

| Vreme nakon tretmana(h) | Srednja spektralna snaga delta talasa ($\mu V^2/Hz$) | | | | Relativna spektralna snaga delta talasa (%) | | | |
|-------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|---|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Kontrola | TAA ₃₀₀ | TAA ₆₀₀ | TAA ₉₀₀ | Kontrola | TAA ₃₀₀ | TAA ₆₀₀ | TAA ₉₀₀ |
| 22,5 | 447,34±76,23 | 391,61±124,86 | 855,91±156,10** | 173,97±44,61** | 66,2±0,6 | 53,5±1,9** | 50,3±1,9** | 78,5±0,2** |
| 23,0 | 650,99±195,64 | 415,81±67,14 | 942,18±223,49** | 193,08±50,75** | 72,8±0,7 | 39,3±0,2** | 71,0±2,6 | 79,9±1,5** |
| 23,5 | 507,66±133,86 | 409,34±159,76 | 1205,02±210,93** | 184,17±49,06** | 67,5±0,9 | 55,1±2,6** | 65,1±0,6 | 77,8±0,5** |

Statistička značajnost razlike srednjih ukupnih spektralnih snaga je procenjena korišćenjem dvostruke ANOVE sa Takijevim (Tuckey) *post hoc* testom (**p<0,01 u odnosu na kontrolu).

Za detaljnije informacije videti grafikon 4.5.



Slika 4.2. Reprezentativni EEG snimci eksperimentalnih životinja

A. EEG snimak životinja iz TAA₃₀₀ grupe

B. EEG snimak životinja iz TAA₆₀₀ grupe sa dominantnom visokovoltaznom aktivnošću u delta frekventnom opsegu (0,5-3 Hz)

C. EEG snimak životinja iz TAA₉₀₀ grupe sa dominacijom niskovoltaznih delta talasa

Za detaljnije informacije videti grafikon 4.5.

4.1.4. Uticaj TAA na oksidacijski stres

Nivo MDA u moždanom korteksu je bio značajno viši u TAA₆₀₀ ($0,20 \pm 0,04$ nmol/mg prot.)($p < 0,05$) i TAA₉₀₀ grupi ($0,35 \pm 0,04$ nmol/mg prot.)($p < 0,01$) u poređenju sa kontrolom ($0,11 \pm 0,03$ nmol/mg prot.) 24 h nakon tretmana. Porast MDA je bio značajno izraženiji u TAA₉₀₀ u odnosu na TAA₆₀₀ grupu ($p < 0,01$). U TAA₃₀₀ grupi nivo MDA u korteksu se nije značajno razlikovao u odnosu na kontrolnu grupu ($p > 0,05$; Grafikon 4.6A).

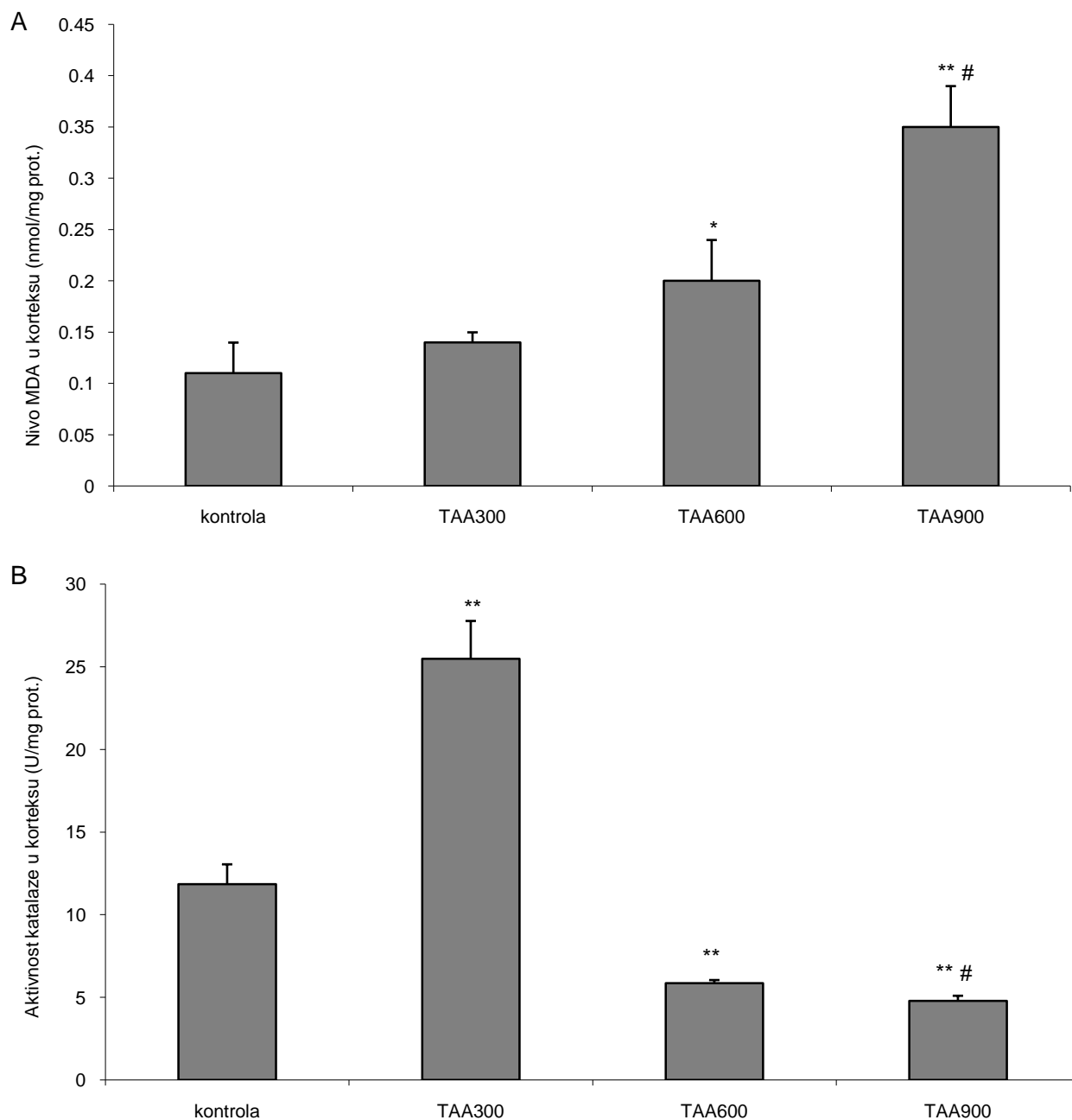
S druge strane, nivo MDA u moždanom stablu je bio značajno viši u svim grupama tretiranim TAA-om u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$). Sa povećanjem doze TAA je izazvao progresivan porast nivoa MDA u moždanom stablu, pri čemu je najmanji porast uočen u TAA₃₀₀ ($0,25 \pm 0,05$ nmol/mg prot.), a najveći u TAA₉₀₀ grupi ($0,52 \pm 0,05$ nmol/mg prot.)(Grafikon 4.7B).

Za razliku od korteksa i moždanog stabla nivo MDA u hipokampusu je bio značajno niži u TAA₃₀₀ grupi ($0,11 \pm 0,01$ nmol/mg prot.) u poređenju sa kontrolom ($0,31 \pm 0,03$ nmol/mg prot.) ($p < 0,01$) 24 h nakon primene TAA. S druge strane nivo MDA je bio značajno viši u TAA₉₀₀ grupi ($0,55 \pm 0,03$ nmol/mg prot.) u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$). Nije uočena značajna razlika u nivou MDA u hipokampusu između TAA₆₀₀ ($0,35 \pm 0,02$ nmol/mg prot.) i kontrolne grupe ($p > 0,05$; Grafikon 4.8A).

Aktivnost katalaze u korteksu je bila značajno viša u TAA₃₀₀ grupi ($25,49 \pm 2,28$ U/mg prot.) u odnosu na kontrolu ($11,85 \pm 1,20$ U/mg prot.)($p < 0,01$). Nasuprot ovome, u TAA₆₀₀ ($5,85 \pm 0,20$ U/mg prot.) i TAA₉₀₀ grupi ($4,78 \pm 0,32$ U/mg prot.) kortikalna aktivnost katalaze je bila značajno niža u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,01$). Pad aktivnosti katalaze je bio izraženiji u TAA₉₀₀ u odnosu na TAA₆₀₀ grupu ($p < 0,01$; Grafikon 4.6B).

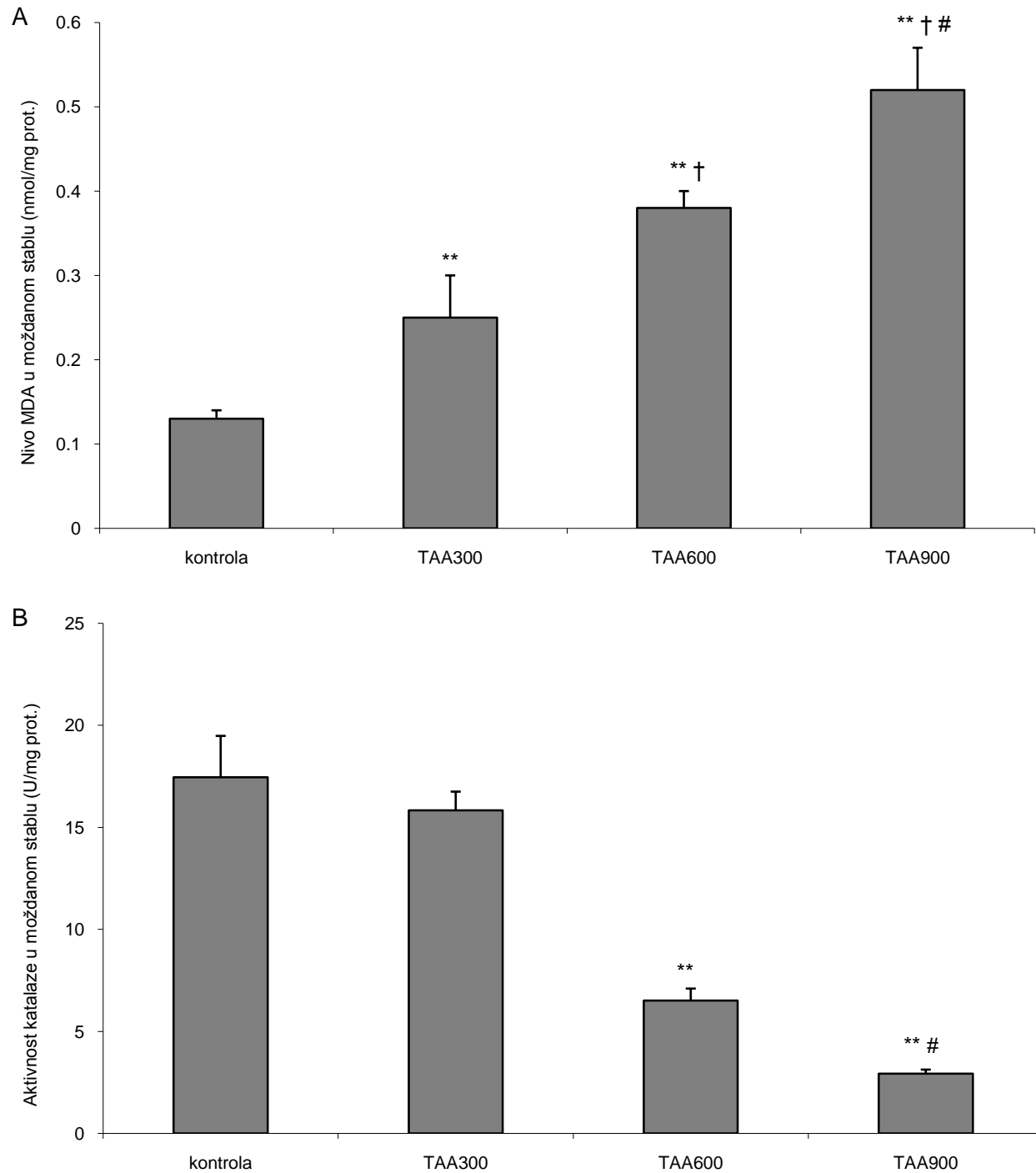
U moždanom stablu aktivnost katalaze je bila značajno niža u TAA₆₀₀ ($6,51 \pm 0,59$ U/mg prot.)($p < 0,01$) i TAA₉₀₀ grupi ($2,93 \pm 0,20$ U/mg prot.)($p < 0,01$) u poređenju sa kontrolom ($17,46 \pm 2,02$ U/mg prot.). Aktivnost ovog enzima u moždanom stablu je bila značajno niža u TAA₉₀₀ u poređenju sa TAA₆₀₀ grupom 24 h nakon primene poslednje doze TAA ($p < 0,01$). U TAA₃₀₀ grupi ($15,83 \pm 0,92$ U/mg prot.) aktivnost katalaze se nije značajno razlikovala u odnosu na kontrolu (Grafikon 4.7B).

Aktivnost katalaze u hipokampusu je bila značajno viša u TAA₃₀₀ ($17,56 \pm 1,22$ U/mg prot.)($p < 0,01$) i TAA₆₀₀ grupi ($38,95 \pm 6,10$ U/mg prot.)($p < 0,01$) u poređenju sa kontrolom ($12,72 \pm 0,66$ U/mg prot.). Izraženiji porast aktivnosti katalaze je uočen u TAA₆₀₀ u odnosu na TAA₃₀₀ grupu ($p < 0,01$). Nasuprot manjim dozama, TAA u dozi od 900 mg/kg je izazvao značajan pad aktivnosti katalaze u hipokampusu ($6,98 \pm 1,31$ U/mg prot.)($p < 0,01$) u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 4.8B).



Grafikon 4.6. Uticaj tioacetamida (TAA) na nivo malondialdehida (MDA)(A) i aktivnost katalaze (B) u moždanom korteksu pacova. Dnevne doze TAA (300 mg/kg) su administrirane intraperitonealno tokom jednog (TAA₃₀₀), dva (TAA₆₀₀) ili tri uzastopna dana (TAA₉₀₀). Uzorci mozga za analizu su uzeti 24 h nakon primene poslednje doze TAA.

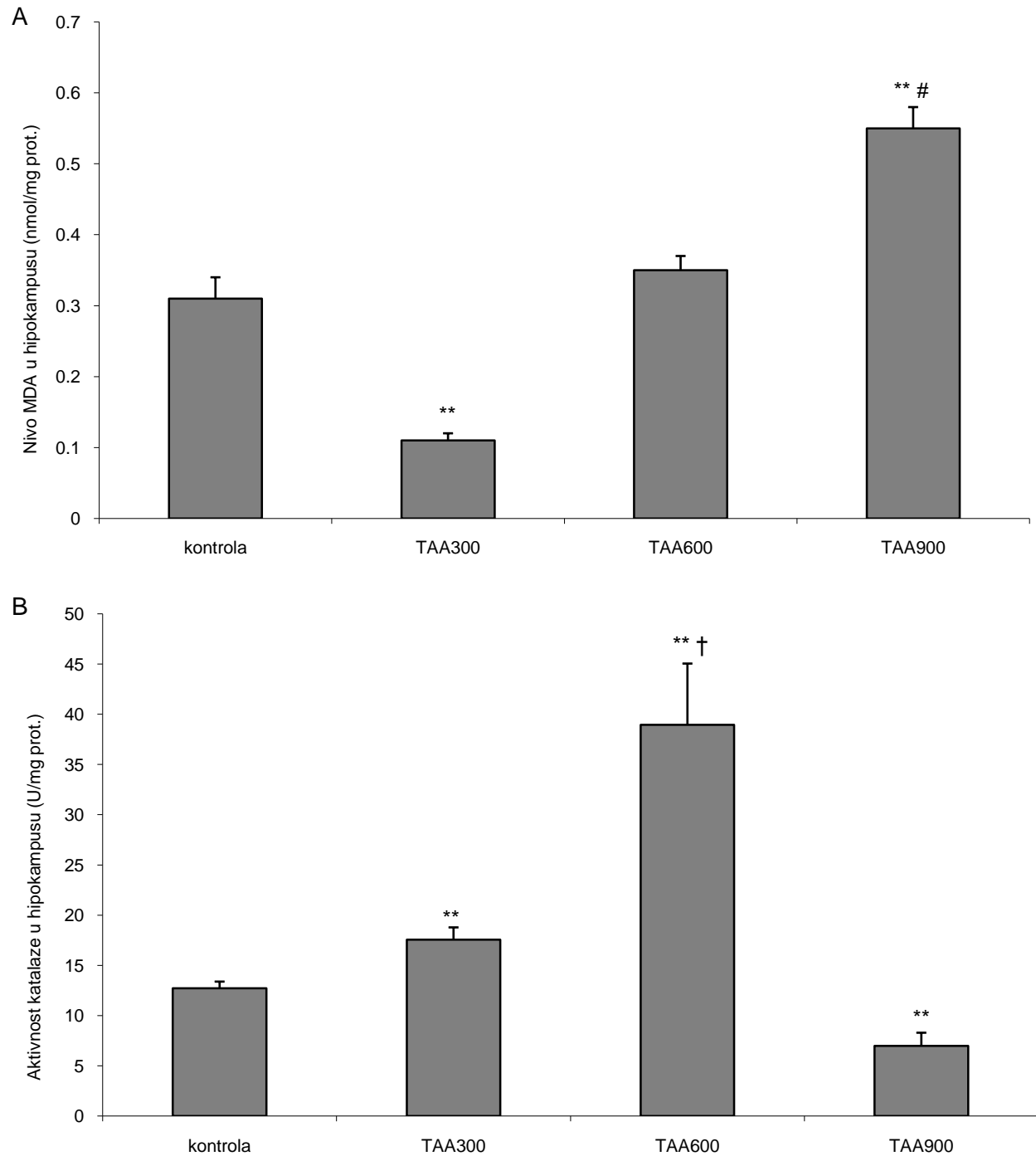
Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem jednostruke ANOVE sa Fišerovim (Fisher) *post hoc* testom (* $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,01$ u odnosu na TAA₆₀₀ grupu).



Grafikon 4.7. Uticaj tioacetamida (TAA) na nivo malondialdehida (MDA)(A) i aktivnost katalaze (B) u moždanom stablu pacova.

Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem jednostruke ANOVE sa Fišerovim (Fisher) *post hoc* testom (** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,01$ u odnosu na TAA₆₀₀ grupu, † $p < 0,01$ u odnosu na TAA₃₀₀ grupu).

Za detaljnije informacije videti grafikon 4.6.



Grafikon 4.8. Uticaj tioacetamida (TAA) na nivo malondialdehida (MDA)(A) i aktivnost katalaze (B) u hipokampusu pacova.

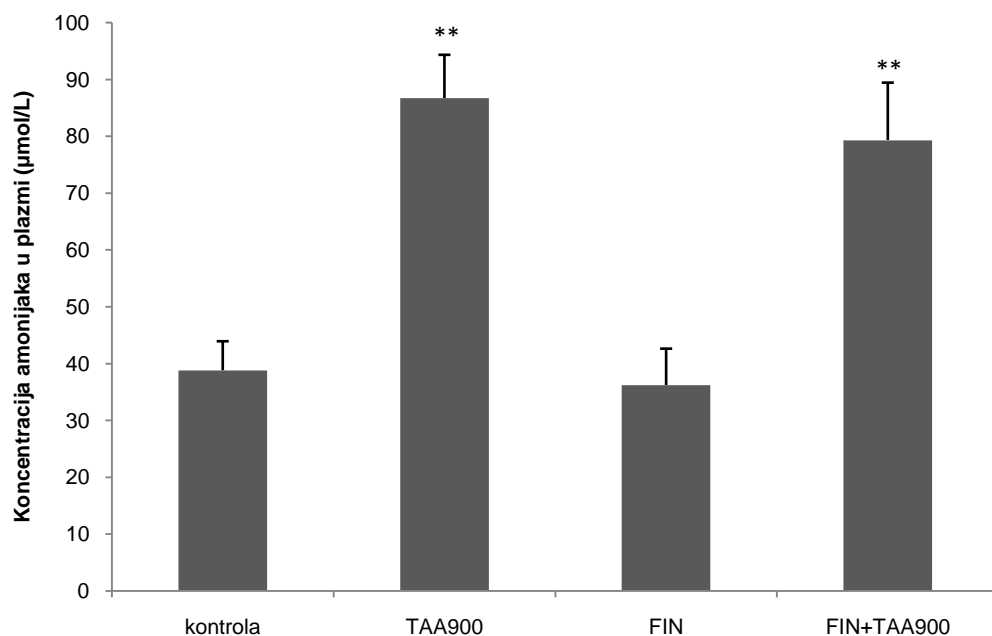
Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem jednostruke ANOVE sa Fišerovim (Fisher) *post hoc* testom (** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,01$ u odnosu na TAA₆₀₀ grupu, † $p < 0,01$ u odnosu na TAA₃₀₀ grupu).

Za detaljnije informacije videti grafikon 4.6.

4.2. Uticaj finasterida na bihevioralne, EEG i ćelijske promene u HE izazvanoj TAA

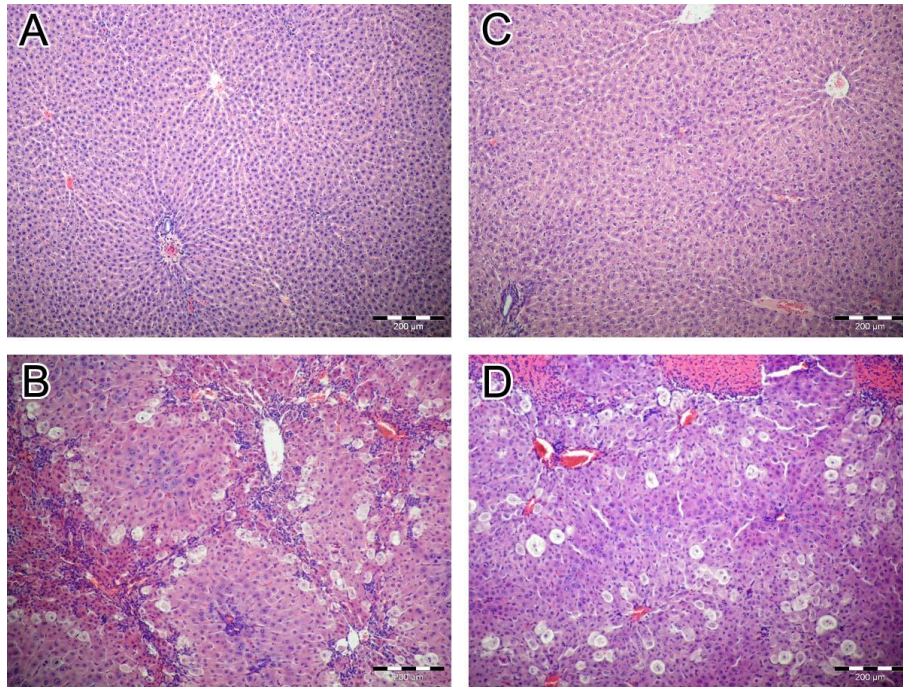
Koncentracija amonijaka u krvi je bila značajno viša ($p < 0,01$) kod pacova iz TAA₉₀₀ ($86,7 \pm 7,6 \mu\text{mol/L}$) i iz FIN+TAA₉₀₀ grupe ($79,3 \pm 10,1 \mu\text{mol/L}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($38,8 \pm 5,1 \mu\text{mol/L}$). Pacovi koji su dobijali samo FIN nisu pokazivali značajnu promenu ($p > 0,05$) u koncentraciji amonijaka u krvi u odnosu na kontrolu. Takođe, nije postojala statistički značajna razlika između pacova iz TAA₉₀₀ i FIN+TAA₉₀₀ grupe (Grafikon 4.9).

FIN nije izazvao nikakve patološke promene u jetri, a lobularna organizacija i radijalni raspored hepatocita u jetri su bili potpuno očuvani (Slika 4.3C). Dok je TAA izazvao konfluentnu centrolobularnu ili premošćavajuću nekrozu sa zapaljenjskim infiltratom u jetri (Slika 4.3B), u FIN+TAA₉₀₀ grupi balonska degeneracija hepatocita je bila izraženija, a inflamacija u nekrotičnim zonama manje izražena nego u TAA₉₀₀ grupi. Duktusna proliferacija i mestimične mitoze hepatocita su takođe uočljive u FIN+TAA₉₀₀ grupi (Slika 4.3D).



Grafikon 4.9. Uticaj finasterida (FIN) i tioacetamida (TAA) na koncentraciju amonijaka u plazmi. Dnevne doze FIN (50 mg/kg) i TAA (300 mg/kg) su administrirane intraperitonealno tokom tri uzastopna dana, a u FIN+TAA₉₀₀ grupi FIN je primenjen 2 h pre svake doze TAA. Krv za analizu je uzeta iz desne polovine srca 24 h nakon primene poslednje doze TAA.

Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena jednostrukom ANOVA-om sa Fišerovim (Fisher) *post hoc* testom (**p<0,01 u odnosu na kontrolu).



Slika 4.3. Patohistološke promene u jetri izazvane tioacetamidom (TAA) i finasteridom (FIN)

- A. Normalna jetra kontrolnih životinja
- B. Premošćavajuća nekroza sa zapaljenjskim infiltratom i fokalnim krvarenjem u jetri u TAA₉₀₀ grupi
- C. Normalna jetra očuvane lobularne organizacije i radijalnog rasporeda hepatocita kod životinja tretiranih FIN-om
- D. Konfluentna centrilobularna nekroza hepatocita u FIN+TAA₉₀₀ grupi (H&E bojenje)

4.2.1. Bihevioralni testovi

Nijedna životinja iz FIN i FIN+TAA₉₀₀ grupe nije uginula 24 h nakon tretmana (0/8). Ukupna OBT je bila značajno niža u TAA₉₀₀ grupi u odnosu na kontrolu ($p<0,01$), sa najnižom vrednošću medijane 24 h nakon tretmana (4 (0, 4)). Iako je ukupna OBT bila značajno niža u FIN+TAA₉₀₀ u odnosu na kontrolnu grupu ($p<0,05$), ta ocena je bila značajno viša u odnosu na životinje iz TAA₉₀₀ grupe tokom čitavog perioda od 24 h nakon primene poslednje doze TAA ($p<0,01$). Sam FIN nije izazvao značajne promene u ukupnoj OBT u poređenju sa kontrolnom grupom ($p>0,05$) (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Uticaj finasterida (FIN) i tioacetamida (TAA) na ukupnu ocenu eksperimentalnih životinja na bihevioralnim testovima (OBT).

| Vreme (h) | Ukupna ocena na bihevioralnim testovima (OBT) | | | |
|-----------|---|-------------|--------------------|------------------------|
| | Kontrola | FIN | TAA ₉₀₀ | FIN+TAA ₉₀₀ |
| 0 | 40 (40,40) | 40 (40, 40) | 15 (1, 22)** | 34 (34, 35,25)*# |
| 2 | 40 (40,40) | 40 (40, 40) | 10 (1, 20)** # | 33,5 (33, 34,25)*# |
| 4 | 40 (40,40) | 40 (40, 40) | 10 (1, 17)** # | 33,5 (32,25, 34,25)*# |
| 6 | 40 (40,40) | 40 (40, 40) | 10 (1, 17)** # | 34 (32,5, 35)* # |
| 24 | 40 (40,40) | 40 (40, 40) | 4 (0, 4)** # | 34 (33, 34)* # |

Dnevne doze FIN (50 mg/kg) i TAA (300 mg/kg) su administrirane intraperitonealno tokom tri uzastopna dana, a u FIN+TAA₉₀₀ grupi FIN je primenjen 2 h pre svake doze TAA.

Bihevioralni testovi su vršeni 0, 2, 4, 6 i 24 h nakon primene poslednje doze TAA. Na svakom testu životinja je mogla dobiti maksimalnu ocenu 4 (ocena 4, ako je brzina izvođenja testa 75-100% kontrolnih vrednosti; ocena 3, 50-75% kontrolnih vrednosti; ocena 2, 25-50% kontrolnih vrednosti; ocena 1, 1-25% kontrolnih vrednosti, ocena 0 ukoliko životinja ne izvodi test). Ukupna OBT je izračunata kao zbir ocena dobijenim na pojedinačnim bihevioralnim testovima.

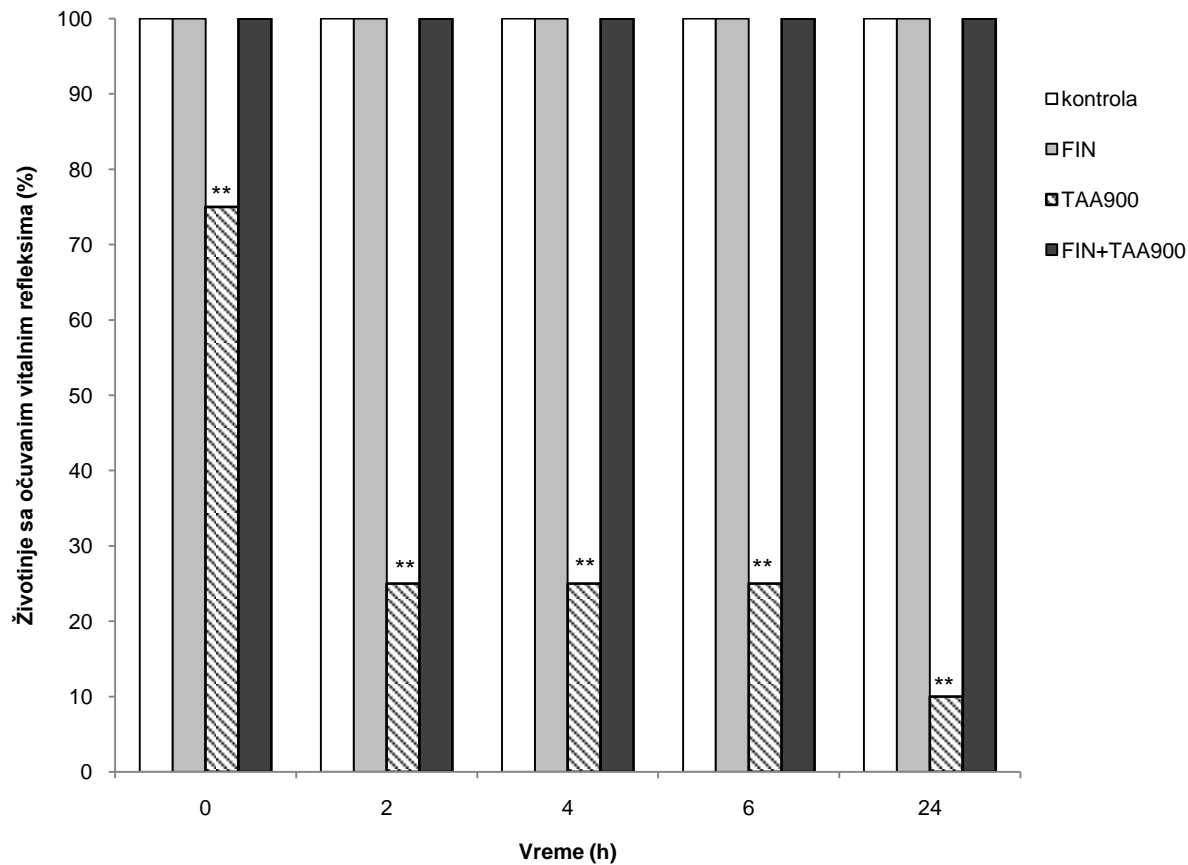
Rezultati su prikazani kao medijane sa 25. i 75. percentilom u zagradi. Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena Fridmanovim (Friedman) neparametarskim testom (* $p<0,05$ i ** $p<0,01$ u odnosu na kontrolu, # $p<0,01$ u odnosu na TAA₉₀₀ grupu).

Dok je učestalost očuvanih vitalnih refleksa (kornealni refleks, refleksi uklanjaња, hvatanja i uspravljanja) bila značajno niža u TAA₉₀₀ grupi u odnosu na kontrolu tokom čitavog perioda praćenja ($p < 0,01$) sa najnižom učestalošću 24 h nakon primene TAA (10%), ovi refleksi su bili očuvani kod svih životinja iz FIN i FIN+TAA₉₀₀ grupe (Grafikon 4.10).

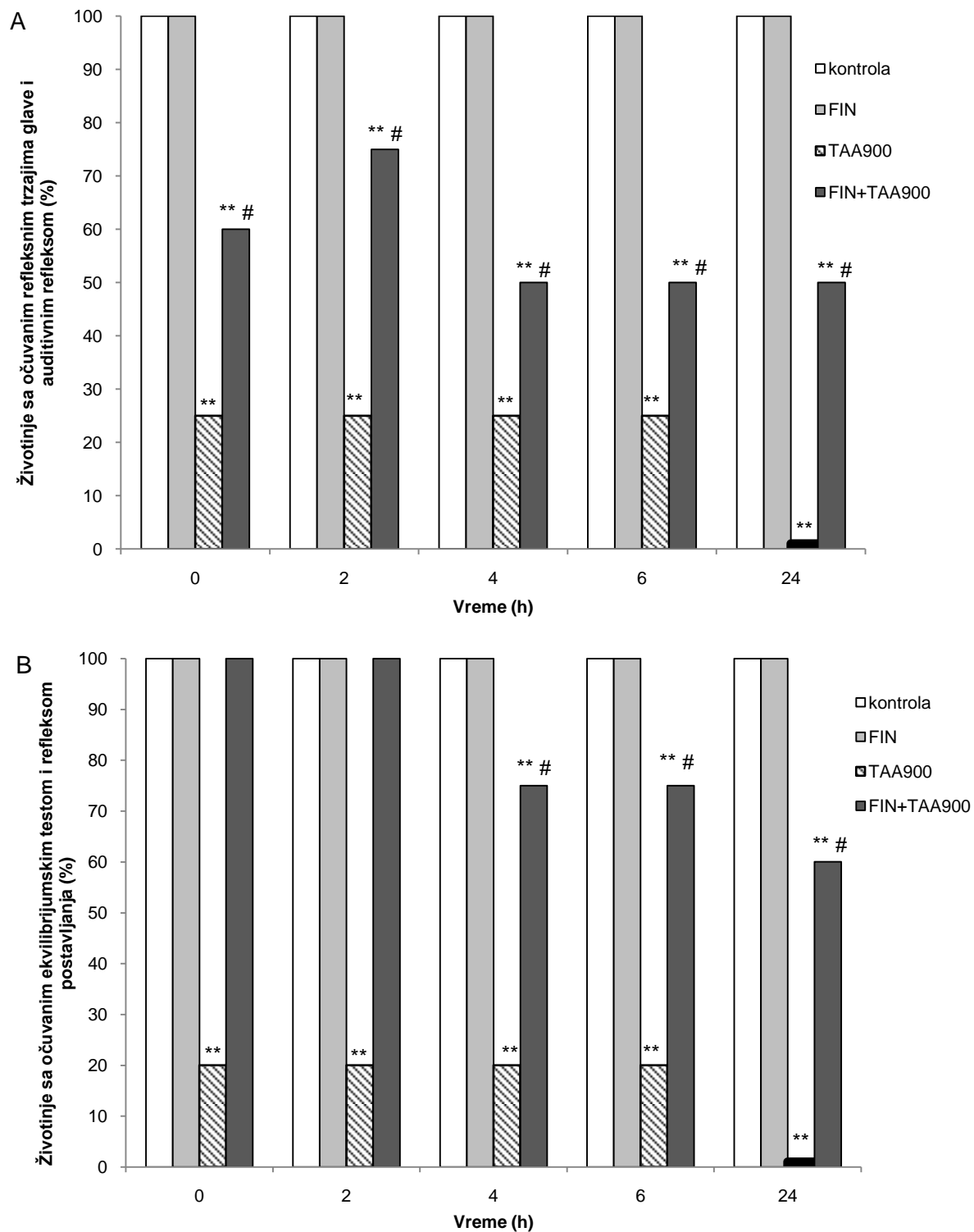
Refleksni trzaji glave i auditivni refleks su bili značajno oslabljeni u TAA₉₀₀ grupi u odnosu na kontrolu tokom čitavog perioda praćenja ($p < 0,01$) i ugašeni 24 h nakon primene TAA. Iako je učestalost očuvanih refleksnih trzajeva glave i auditivnog refleksa bila niža u FIN+TAA₉₀₀ nego u kontrolnoj grupi u periodu od 24 h nakon tretmana ($p < 0,01$), očuvanost ovih refleksa je bila značajno veća nego u TAA₉₀₀ grupi ($p < 0,01$). Najniža učestalost refleksnih trzajeva glave i auditivnog refleksa u FIN+TAA₉₀₀ grupi je bila zabeležena 4, 6 i 24 h nakon tretmana (50%). Sve životinje iz FIN grupe su imale potpuno očuvane ove reflekse (Grafikon 4.11A).

Dok je očuvanost ekvilibrijumskog testa i refleksa postavljanja bila značajno niža u TAA₉₀₀ grupi u odnosu na kontrolu tokom čitavog perioda praćenja ($p < 0,01$), sve životinje iz FIN+TAA₉₀₀ grupe su izvodile ove testove u fiziološkim granicama 2 h nakon tretmana TAA-om. Tokom vremena očuvanost ovih testova je bila značajno niža 4, 6 i 24 h nakon tretmana u FIN+TAA₉₀₀ grupi u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$). Međutim, tokom čitavog perioda, očuvanost ekvilibrijumskog testa i refleksa postavljanja je bila značajno viša u FIN+TAA₉₀₀ u odnosu na TAA₉₀₀ grupu ($p < 0,01$). Sve životinje iz FIN grupe su normalno izvodile ove testove (Grafikon 4.11B).

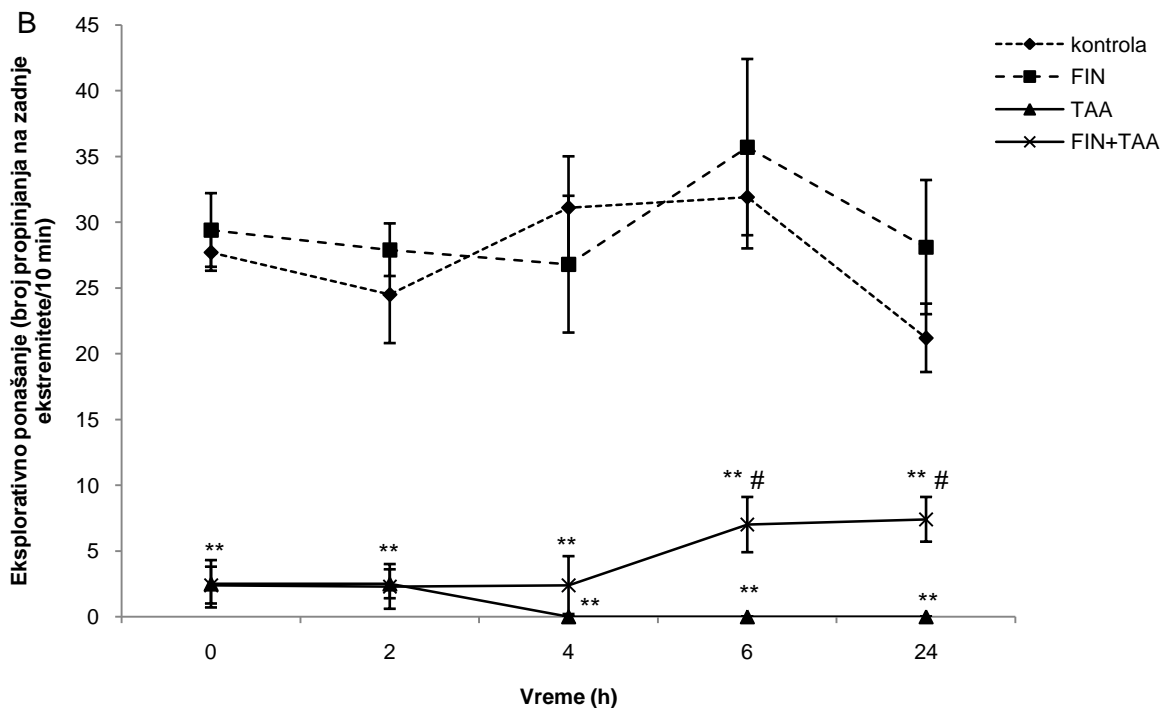
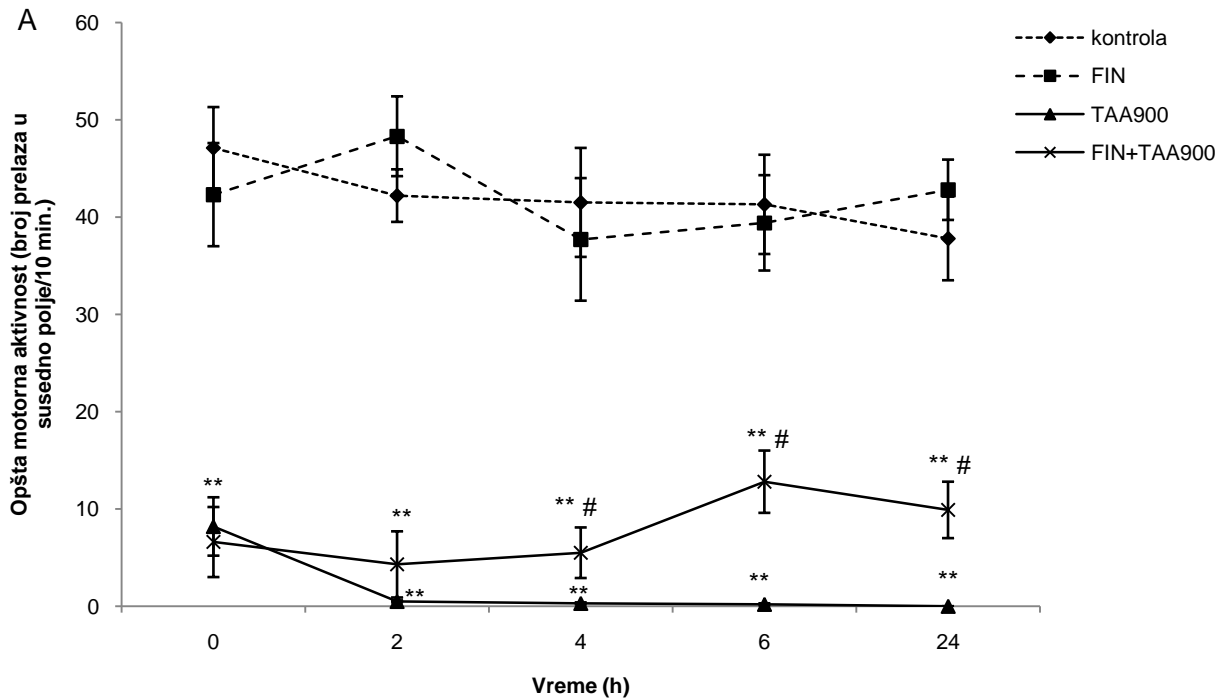
Opšta motorna aktivnost i eksplorativno ponašanje su bili značajno niži u TAA₉₀₀ i FIN+TAA₉₀₀ grupi u odnosu na kontrolu tokom čitavog perioda praćenja ($p < 0,01$). Međutim, životinje iz FIN+TAA₉₀₀ grupe su imale značajno bolju opštu motornu aktivnost u poređenju sa životinjama iz TAA₉₀₀ grupe 4, 6 i 24 h nakon aplikacije poslednje doze TAA ($p < 0,01$; Grafikon 4.12A). Eksplorativno ponašanje, takođe je bilo značajno izraženije u FIN+TAA₉₀₀ u odnosu na TAA₉₀₀ grupu 6 i 24 h nakon tretmana ($p < 0,01$; Grafikon 4.12B). Nije postojala statistički značajna razlika ($p > 0,05$) u izvođenju ovih testova između životinja iz FIN i kontrolne grupe.



Grafikon 4.10. Uticaj finasterida (FIN) i tioacetamida (TAA) na vitalne reflekse (kornealni refleks, refleks uklanjanja, hvatanja i uspravljanja) eksperimentalnih životinja. Dnevne doze FIN (50 mg/kg) i TAA su administrirane intraperitonealno tokom tri uzastopna dana, a u FIN+TAA₉₀₀ grupi FIN je primenjen 2 h pre svake doze TAA. Vitalni refleksi su ispitivani 0, 2, 4, 6 i 24 h nakon primene poslednje doze TAA. Statistička značajnost razlike je procenjena korišćenjem hi-kvadrat testa (**p<0,01 u odnosu na kontrolu).



Grafikon 4.11. Uticaj finasterida (FIN) i tioacetamida (TAA) na refleksne trzaje glave, auditivni refleks (A), refleks postavljanja i ekvilibrijumski test (B) eksperimentalnih životinja. Statistička značajnost razlike je procenjena korišćenjem hi-kvadrat testa (** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,01$ u odnosu na TAA₉₀₀ grupu). Za detaljnije informacije videti grafikon 4.10.



Grafikon 4.12. Uticaj finasterida (FIN) i tioacetamida (TAA) na opštu motornu aktivnost (A) i eksplorativno ponašanje (B). Opšta motorna aktivnost je izražena kao broj prelazaka životinje iz jednog polja u drugo u periodu od 10 min, dok je eksplorativno ponašanje izraženo kao broj propinjanja životinje na zadnje ekstremitete u istom periodu.

Statistička značajnost razlike je procenjena korišćenjem dvostruke ANOVE sa Takijevim (Tuckey) *post hoc* testom (** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,01$ u odnosu na TAA₆₀₀ grupu).

Za detaljnije informacije videti grafikon 4.10.

4.2.2. Analiza EEG-a

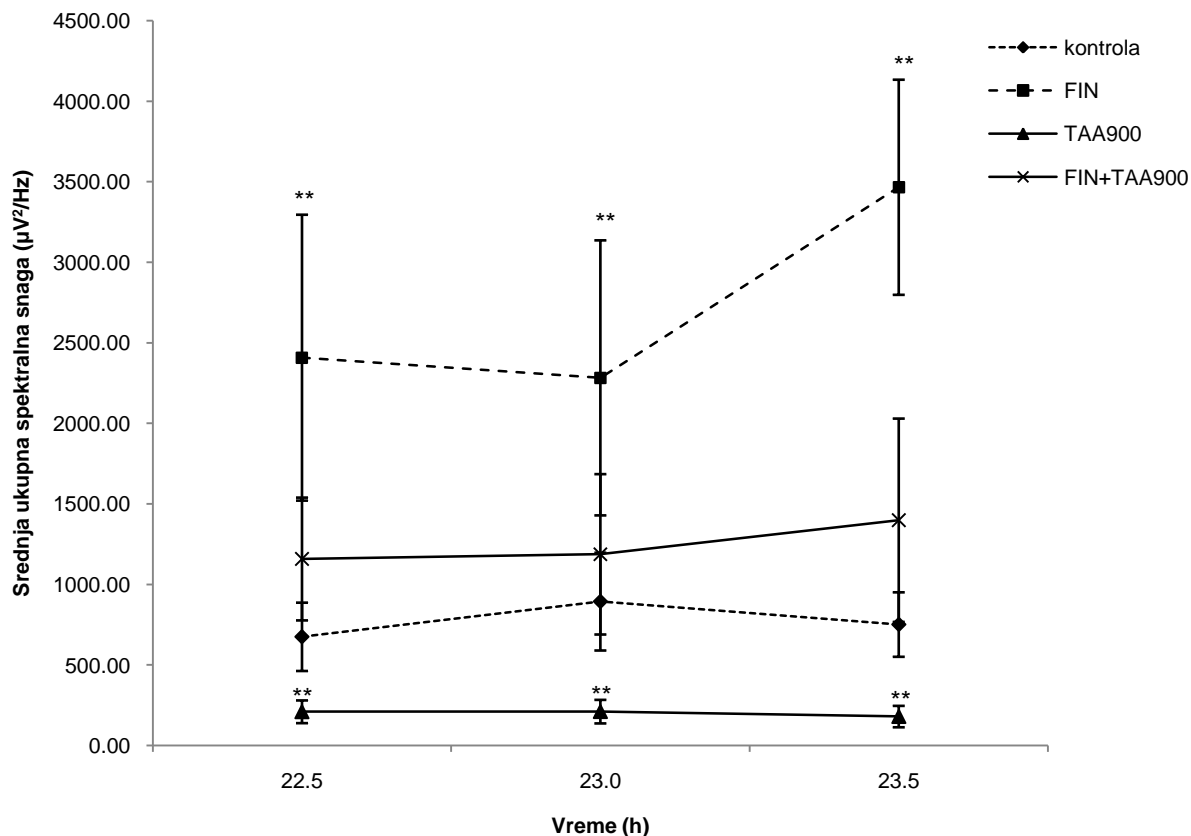
Dok je srednja ukupna spektralna snaga bila značajno niža u TAA₉₀₀ grupi u poređenju sa kontrolom 22,5 h, 23 h i 23,5 h nakon primene poslednje doze TAA ($p < 0,01$), nisu uočene značajne promene srednje spektralne snage u FIN+TAA₉₀₀ grupi u odnosu na kontrolu u svim vremenskim tačkama ($p > 0,05$). Međutim, sam FIN je izazvao značajan porast srednje ukupne spektralne snage u poređenju sa kontrolom u svim vremenskim tačkama ($p < 0,01$; Grafikon 4.13).

Dok u TAA₉₀₀ grupi nisu nađene značajne promene u beta opsegu, u FIN i FIN+TAA₉₀₀ grupi srednja spektralna snaga beta talasa je bila značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,01$) u svim vremenskim tačkama (Grafikon 4.14A). Dok se relativna spektralna snaga beta talasa nije razlikovala u TAA₉₀₀ grupi u poređenju sa kontrolom ($p > 0,05$), u FIN+TAA₉₀₀ grupi relativna snaga beta talasa je bila značajno viša u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$). Nasuprot ovome, sam FIN je izazvao značajno smanjenje relativne snage beta talasa u odnosu na kontrolnu grupu u svim vremenskim tačkama ($p < 0,01$; Grafikon 4.14B).

Srednja spektralna snaga u alfa opsegu je bila značajno niža u TAA₉₀₀ grupi ($p < 0,01$) i značajno viša u FIN ($p < 0,01$) i FIN+TAA₉₀₀ grupama ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolu (Grafikon 4.15A). Dok TAA nije izazvao značajne promene relativne spektralne snage alfa talasa u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$), u FIN i FIN+TAA₉₀₀ grupama zapazili smo značajan porast relativne spektralne snage u alfa opsegu u poređenju sa kontrolom (Grafikon 4.15B).

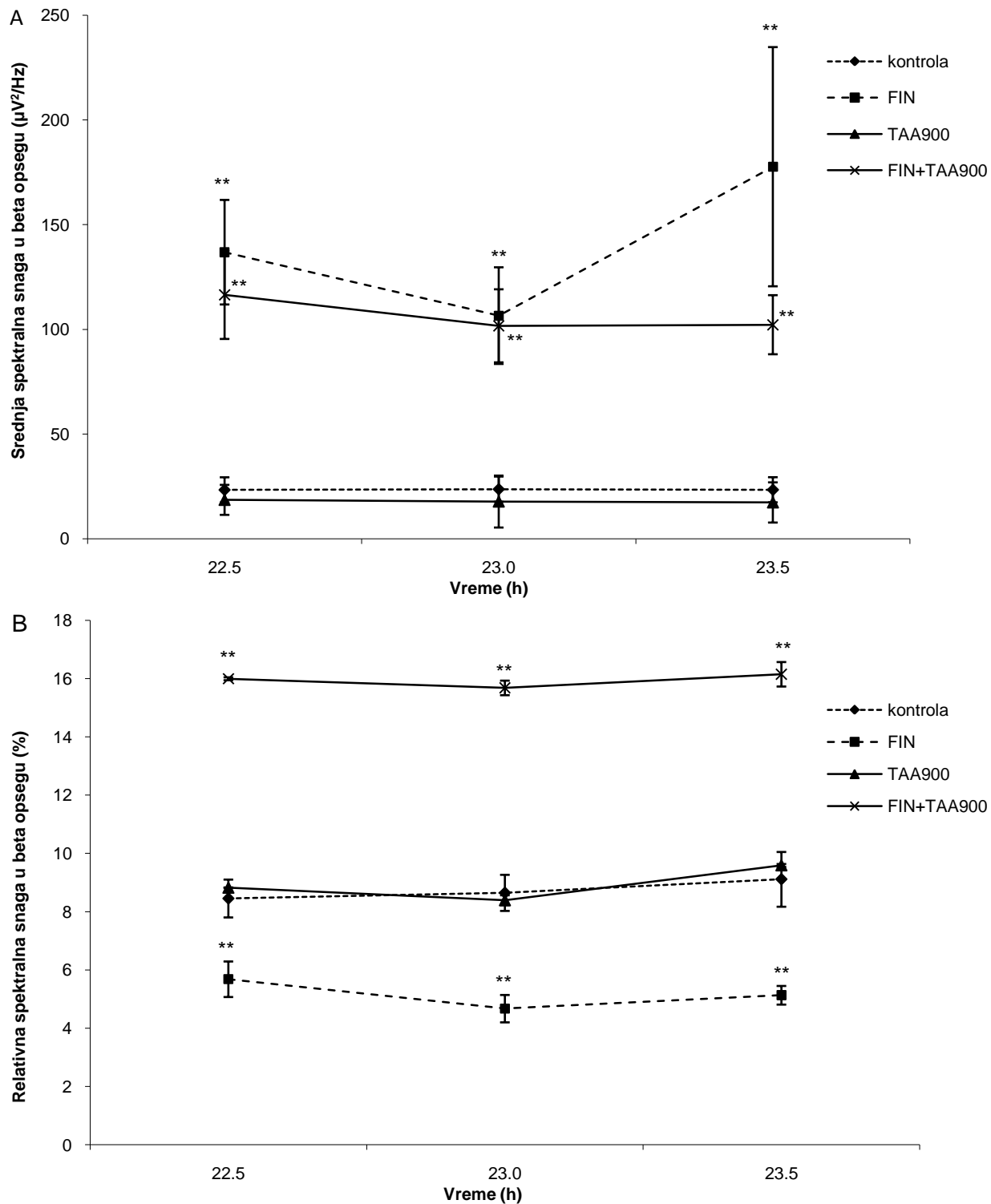
U teta opsegu uočen je značajan porast srednje spektralne snage u FIN ($p < 0,01$) i pad u TAA₉₀₀ grupi ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolu u svim vremenskim tačkama. Međutim, u FIN+TAA₉₀₀ grupi nije došlo do značajne promene srednje spektralne snage teta talasa u poređenju sa kontrolnom grupom ($p > 0,05$; Grafikon 4.16A). S druge strane, relativna spektralna snaga u teta opsegu je bila značajno niža u TAA₉₀₀ grupi ($p < 0,01$) i značajno viša u FIN+TAA₉₀₀ grupi ($p < 0,01$) u poređenju sa kontrolom u svim vremenskim tačkama. Sam FIN je takođe uzrokovao značajan porast relativne snage u teta frekventnom opsegu u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$) ali se relativne spektralne snage nisu značajno razlikovale u FIN i FIN+TAA₉₀₀ grupi ($p > 0,05$; Grafikon 4.16B).

Dominantna EEG aktivnost u svim grupama je uočena u delta frekventnom opsegu (EEG ocena 3). Međutim, apsolutna spektralna snaga u delta opsegu je bila značajno niža u grupi tretiranoj TAA-om ($p < 0,01$) i značajno viša u FIN ($p < 0,01$) i FIN+TAA₉₀₀ grupi u odnosu na kontrolu u svim vremenskim tačkama (Grafikon 4.17A). S druge strane, dok je relativna spektralna snaga delta talasa bila značajno viša u TAA₉₀₀ grupi ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolu, relativna snaga u delta opsegu je bila značajno niža u FIN ($p < 0,01$) i FIN+TAA₉₀₀ grupi ($p < 0,01$) u poređenju sa kontrolom. FIN u kombinaciji sa TAA-om je izazvao izraženiji pad relativne spektralne snage delta talasa u odnosu na sam FIN 23 h ($p < 0,01$) i 23,5 h ($p < 0,01$) nakon tretmana (Grafikon 4.17B).



Grafikon 4.13. Uticaj finasterida (FIN) i tioacetamida (TAA) na srednju ukupnu spektralnu snagu pacova. Dnevne doze FIN (50 mg/kg) i TAA (300 mg/kg) su administrirane intraperitonealno tokom tri uzastopna dana, a u FIN+TAA₉₀₀ grupi FIN je primenjen 2 h pre svake doze TAA. EEG je registrovan u periodu od 22-24 h nakon primene poslednje doze TAA i analiziran u intervalima od 30 minuta (u vremenskim tačkama 22,5, 23 i 23,5 h). U svakoj tački deo EEG-a bez artefakta je podeljen na 8 epoha od po 12 s i analiziran brzom Furijeovom (Fourier) transformacijom.

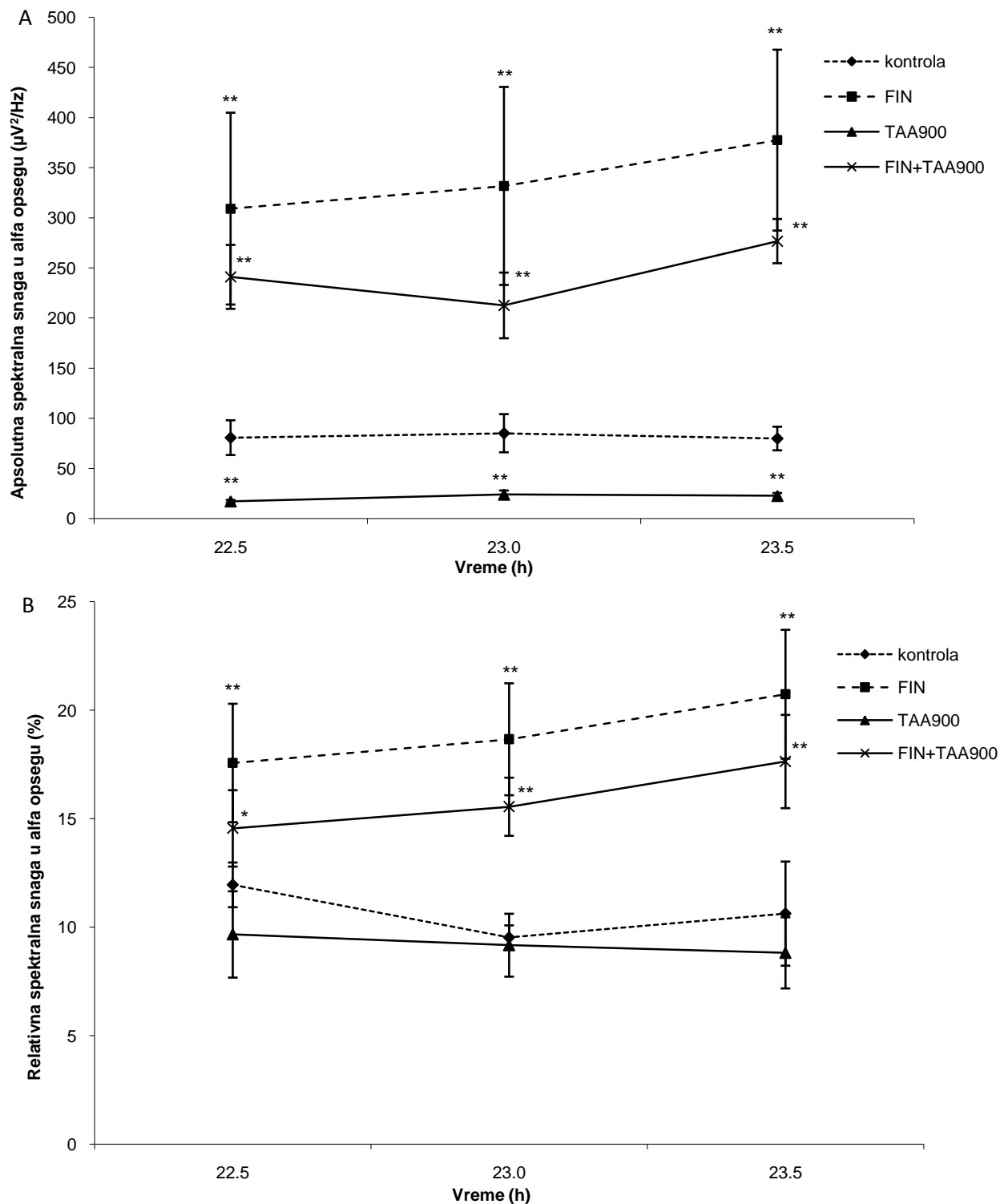
Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem dvostruke ANOVE sa Takijevim (Tuckey) post hoc testom (**p<0,01 u odnosu na kontrolu).



Grafikon 4.14. Uticaj finasterida (FIN) i tioacetamida (TAA) na srednju (A) i relativnu spektralnu snagu (B) beta talasa (14-30 Hz).

Statistička značajnost razlike spektralnih snaga je procenjena korišćenjem dvostruke ANOVE sa Takijevim (Tuckey) *post hoc* testom (** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu).

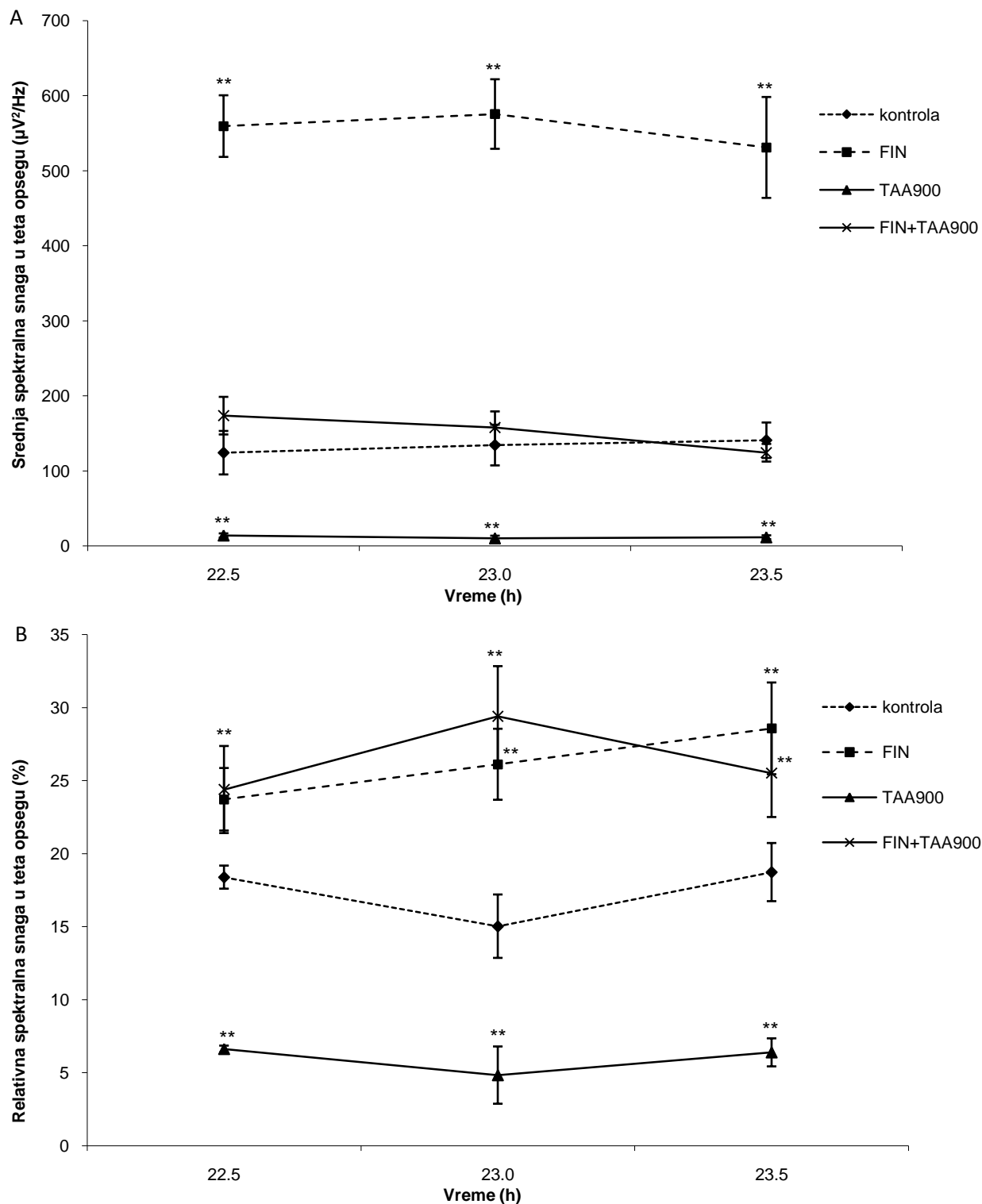
Za detaljnije informacije videti grafikon 4.13.



Grafikon 4.15. Uticaj finasterida (FIN) i tioacetamida (TAA) na srednju (A) i relativnu spektralnu snagu (B) alfa talasa (8-13 Hz).

Statistička značajnost razlike spektralnih snaga je procenjena korišćenjem dvostruke ANOVE sa Takijevim (Tuckey) *post hoc* testom (* $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu).

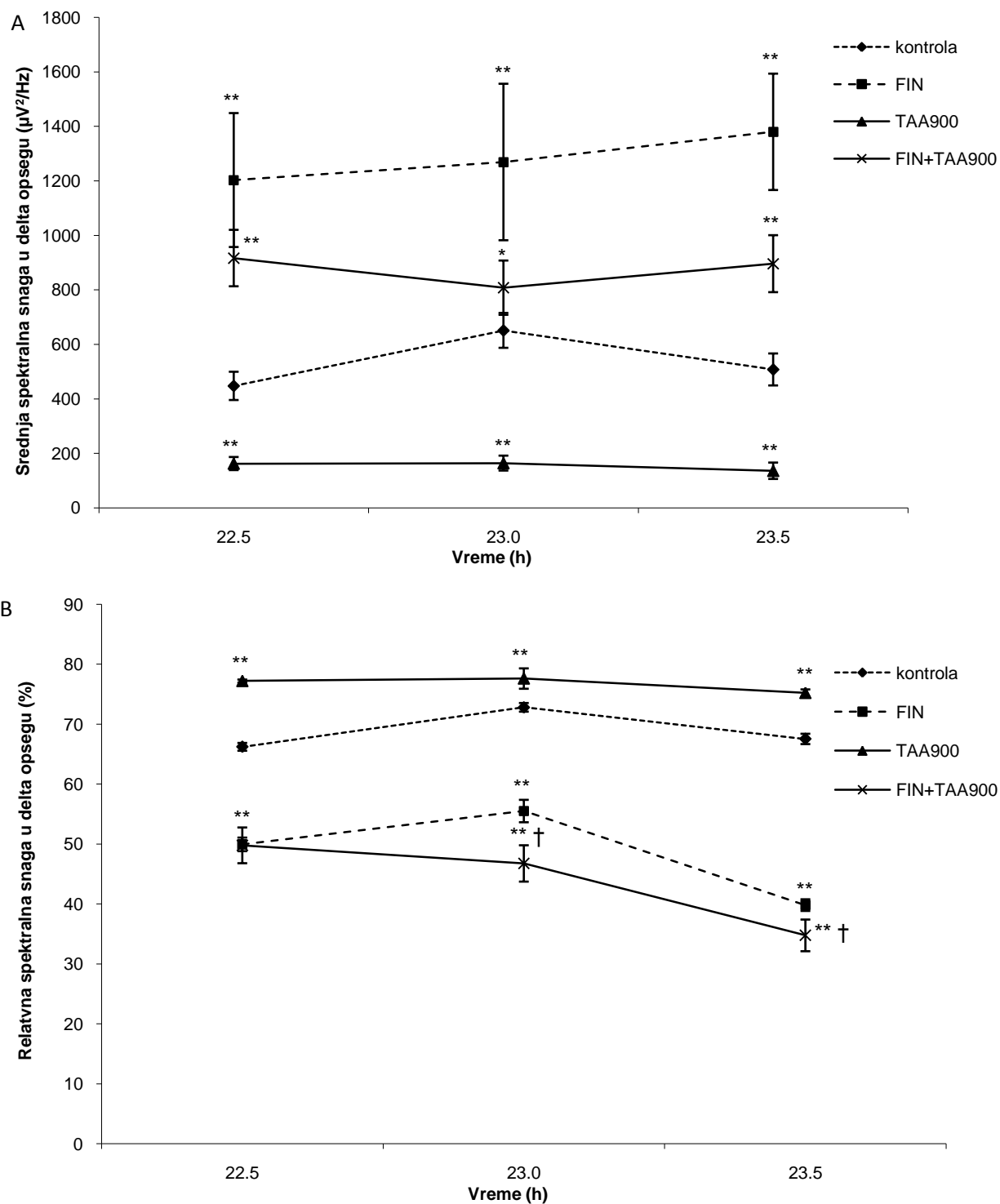
Za detaljnije informacije videti grafikon 4.13.



Grafikon 4.16. Uticaj finasterida (FIN) i tioacetamida (TAA) na srednju (A) i relativnu spektralnu snagu (B) teta talasa (4-7 Hz).

Statistička značajnost razlike spektralnih snaga je procenjena korišćenjem dvostruke ANOVE sa Takijevim (Tuckey) *post hoc* testom (** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu).

Za detaljnije informacije videti grafikon 4.13.



Grafikon 4.17. Uticaj finasterida (FIN) i tioacetamida (TAA) na srednju (A) i relativnu spektralnu snagu (B) delta talasa (0,5-3 Hz).

Statistička značajnost razlike spektralnih snaga je procenjena korišćenjem dvostruke ANOVE sa Takijevim (Tuckey) *post hoc* testom (** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu, † $p < 0,01$ u odnosu na FIN grupu).

Za detaljnije informacije videti grafikon 4.13.

4.2.3. Uticaj finasterida na oksidacijski stres u mozgu izazvan TAA-om

Ekspresija p22-phox subjedinice NADPH oksidaze je bila značajno niža u hipokampusu životinja iz TAA₉₀₀ grupe u poređenju sa kontrolom 24 h nakon primene poslednje doze TAA ($p < 0,01$). Nasuprot ovome, u korteksu nije nađena značajna promena u ekspresiji ove subjedinice između TAA₉₀₀ i kontrolne grupe ($p > 0,05$). Slično kao u TAA₉₀₀ grupi, i u FIN grupi ekspresija p22-phox subjedinice je bila značajno niža u hipokampusu ($p < 0,01$), dok se u korteksu nije značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu grupu ($p > 0,05$). Ekspresija p22-phox u FIN+TAA₉₀₀ grupi se nije razlikovala ni u korteksu ni u hipokampusu u poređenju sa kontrolom ($p > 0,05$; Grafikon 4.18A).

Ekspresija p40-phox subjedinice NADPH oksidaze je bila značajno viša u korteksu životinja iz TAA₉₀₀ ($p < 0,05$) i FIN+TAA₉₀₀ grupe ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu. U FIN grupi nije uočena značajna razlika u kortikalnoj ekspresiji ove subjedinice u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$). U hipokampusu ekspresija p40-phox se nije razlikovala u eksperimentalnim grupama u poređenju sa kontrolom (Grafikon 4.18B).

Ekspresija p47-phox subjedinice u korteksu se nije značajno razlikovala u eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$). Međutim, ekspresija ove subjedinice u hipokampusu je bila značajno niža u TAA₉₀₀ ($p < 0,01$), FIN ($p < 0,01$) i FIN+TAA₉₀₀ grupi ($p < 0,01$) u poređenju sa kontrolom 24 h nakon tretmana (Grafikon 4.18C).

Ekspresija p67-phox subjedinice NADPH oksidaze je bila značajno niža u korteksu ($p < 0,05$) i hipokampusu životinja iz TAA₉₀₀ grupe ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolom. Sam FIN nije izazvao značajne promene u ekspresiji ove subjedinice u odnosu na kontrolu ni u korteksu ni u hipokampusu. U FIN+TAA₉₀₀ grupi ekspresija p67-phox je bila značajno niža u korteksu u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,05$), dok se ekspresija ove subjedinice nije značajno razlikovala u hipokampusu životinja iz FIN+TAA₉₀₀ i kontrolne grupe ($p > 0,05$; Grafikon 4.18D).

Nivo MDA u korteksu, hipokampusu i *nc. caudatusu* je bio značajno veći u TAA₉₀₀ grupi u odnosu na kontrolu 24 h nakon primene poslednje doze TAA ($p < 0,01$). S druge strane, TAA nije izazvao značajnu promenu nivoa MDA u talamusu ($37,68 \pm 6,08$ nmol/mg prot.) u poređenju sa kontrolom ($47,62 \pm 4,42$ nmol/mg prot.) ($p > 0,05$). Sam FIN je smanjio

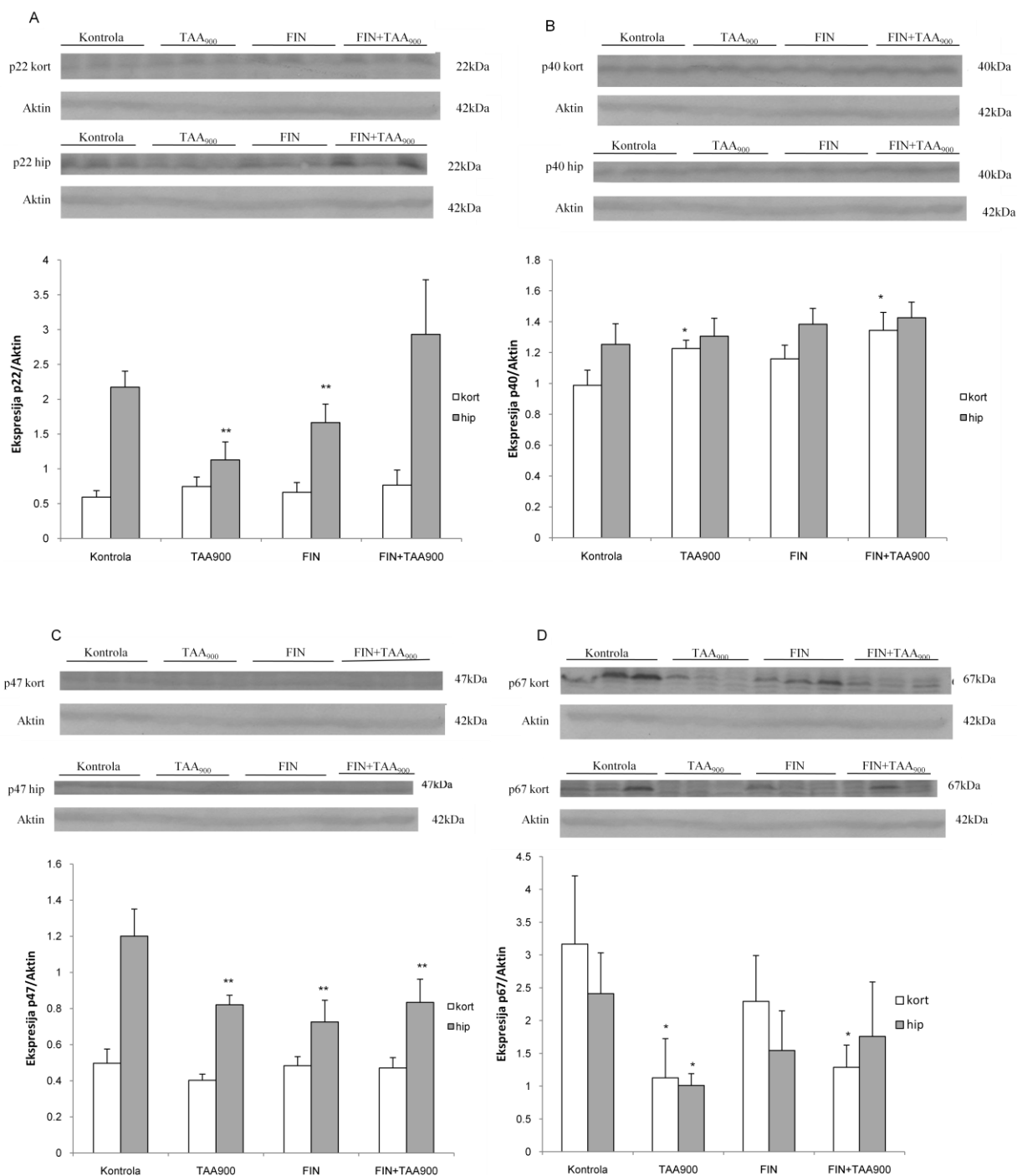
nivo MDA u korteksu ($21,99 \pm 3,84$ nmol/mg prot.)($p < 0,01$), hipokampusu ($29,53 \pm 2,88$ nmol/mg prot.)($p < 0,01$) i talamusu ($34,82 \pm 3,97$ nmol/mg prot.)($p < 0,01$) i povećao nivo MDA u *nc. caudatusu* ($40,93 \pm 4,73$ nmol/mg prot.)($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu. U FIN+TAA₉₀₀ grupi nivo MDA u korteksu ($38,27 \pm 4,74$ nmol/mg prot.)($p > 0,05$) i talamusu ($55,16 \pm 7,56$ nmol/mg prot.)($p > 0,05$) se nije značajno razlikovao u odnosu na kontrolu ($36,17 \pm 5,74$ nmol/mg prot. i $47,62 \pm 4,42$ nmol/mg prot. u korteksu i talamusu), dok je u hipokampusu ($88,63 \pm 13,03$ nmol/mg prot.)($p < 0,01$) i *nc. caudatusu* ($42,07 \pm 2,26$ nmol/mg prot.)($p < 0,01$) bio značajno viši u poređenju sa kontrolnom grupom ($60,20 \pm 7,05$ nmol/mg prot. i $32,40 \pm 2,11$ nmol/mg prot.). Poređenjem FIN+TAA₉₀₀ i TAA₉₀₀ grupe uočeno je da je nivo MDA bio značajno veći u talamusu životinja iz FIN+TAA₉₀₀ grupe u odnosu na TAA₉₀₀ grupu ($p < 0,01$), dok značajna razlika u nivou MDA između TAA₉₀₀ i FIN+TAA₉₀₀ grupe nije uočena u hipokampusu i *nc. caudatusu* ($p > 0,05$; Grafikon 4.19A).

Aktivnost SOD je bila značajno viša u korteksu životinja iz TAA₉₀₀ grupe ($201,02 \pm 35,93$ U/mg prot.) u odnosu na kontrolu ($123,32 \pm 18,52$ U/mg prot.)($p < 0,01$). Nasuprot ovome, u hipokampusu, talamusu i *nc. caudatusu* nije uočena značajna razlika u aktivnosti ovog enzima između TAA₉₀₀ i kontrolne grupe ($p > 0,05$). FIN je izazvao porast aktivnosti SOD u korteksu ($241,65 \pm 28,08$ U/mg prot.)($p < 0,01$) i hipokampusu ($145,68 \pm 16,51$ U/mg prot.)($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu. Aktivnost SOD u korteksu ($229,79 \pm 68,35$ U/mg prot.)($p < 0,01$), hipokampusu ($137,06 \pm 15,43$ U/mg prot.)($p < 0,05$) i *nc. caudatusu* ($129,57 \pm 18,89$ U/mg prot.)($p < 0,05$) je bila značajno viša u FIN+TAA₉₀₀ grupi u poređenju sa kontrolom. S druge strane, aktivnost ovog enzima u talamusu se nije značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu grupu. Ni u jednoj moždanoj strukturi nije uočena značajna razlika u aktivnosti SOD između FIN+TAA₉₀₀ i TAA₉₀₀ grupe ($p > 0,05$; Grafikon 4.19B).

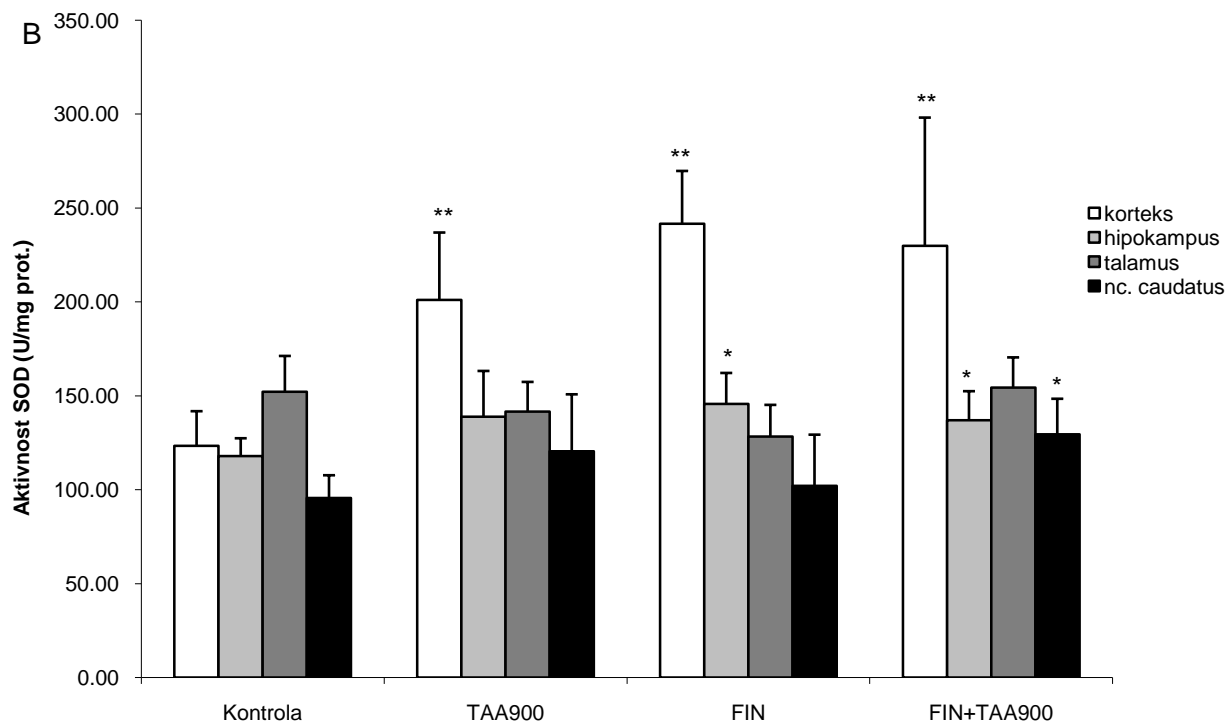
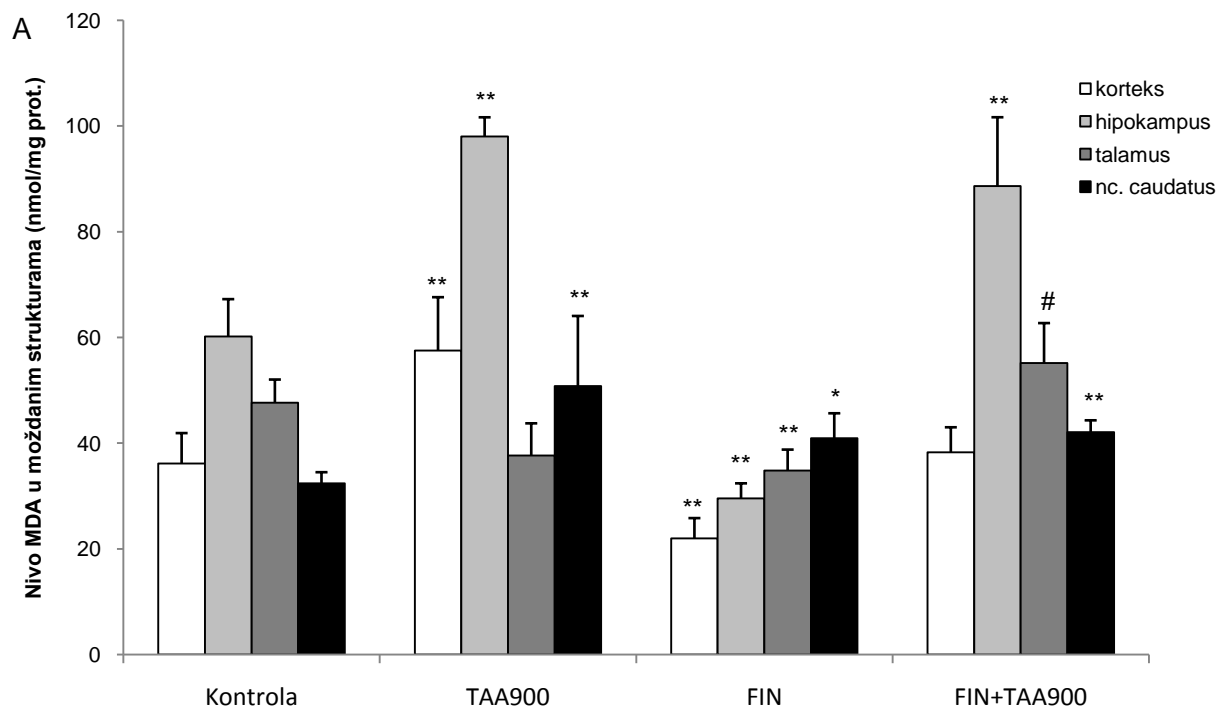
Ekspresija SOD1 u korteksu je bila značajno viša u TAA₉₀₀ grupi ($p < 0,05$), dok se u hipokampusu ekspresija ovog enzima nije značajno promenila u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$). Sam FIN je izazvao značajan porast ekspresije SOD1 u korteksu ($p < 0,01$) i hipokampusu ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolom, koji je u korteksu bio izraženiji nego u TAA₉₀₀ grupi ($p < 0,01$). U FIN+TAA₉₀₀ grupi ekspresija SOD1 je bila značajno viša u korteksu ($p < 0,01$) i hipokampusu ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnom grupom. Dok u

hipokampusu nije postojala značajna razlika u ekspresiji ovog enzima između FIN+TAA₉₀₀ i TAA₉₀₀ grupe, ekspresija SOD1 u korteksu je bila značajno viša u FIN+TAA₉₀₀ u odnosu na TAA₉₀₀ grupu ($p < 0,01$). Međutim, ekspresija ovog izoenzima SOD je bila značajno niža u korteksu u FIN+TAA₉₀₀ grupi u odnosu na FIN grupu ($p < 0,01$; Grafikon 4.20).

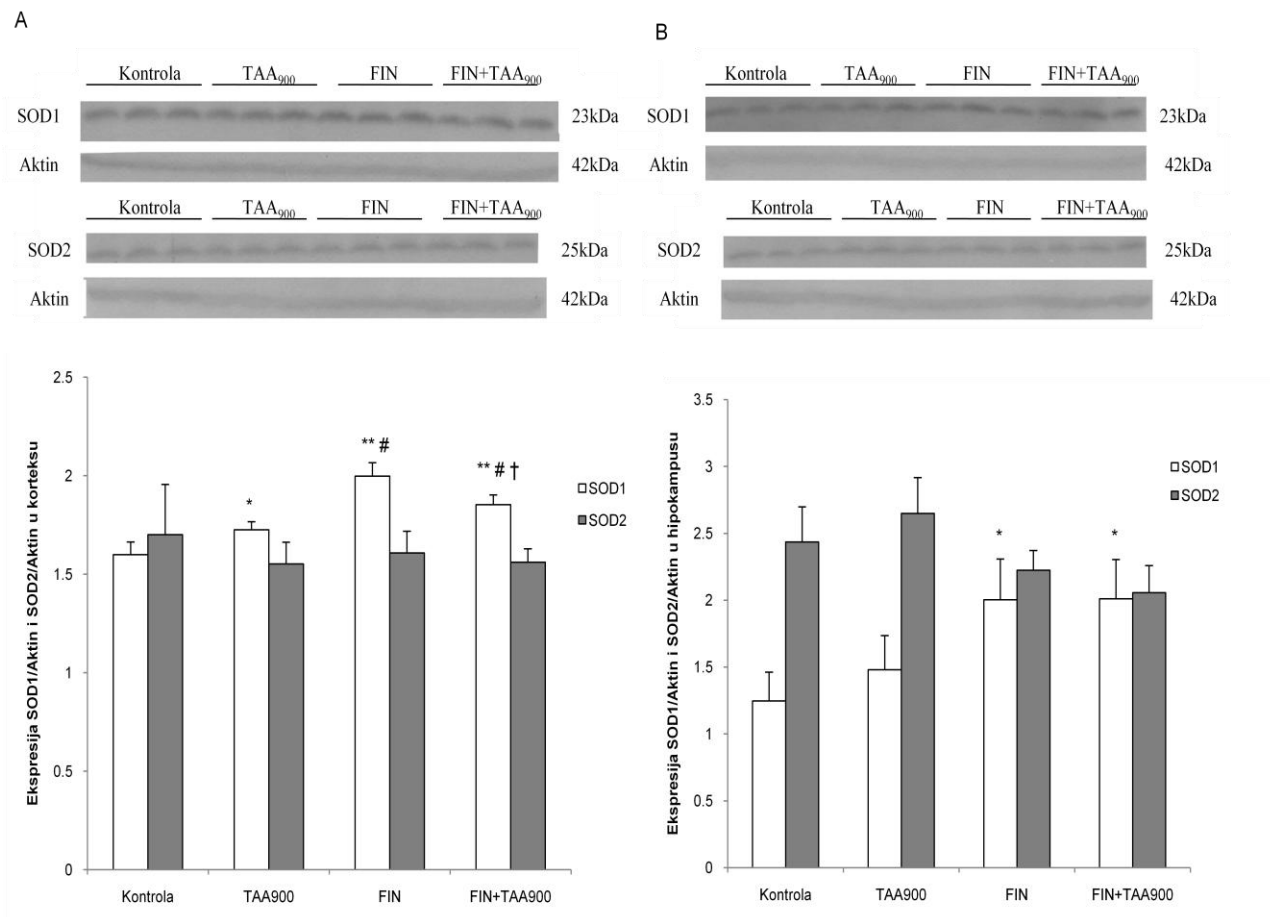
S druge strane, ekspresija SOD2 u korteksu i hipokampusu se nije značajno razlikovala u eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$; Grafikon 4.20).



Grafikon 4.18. Uticaj finasterida (FIN) i tioacetamida (TAA) na ekspresiju p22-phox (A), p40-phox (B), p47-phox (C) i p67-phox subjedinice (D) NADPH oksidaze u korteksu (kort) i hipokampusu (hip) pacova. Dnevne doze FIN (50 mg/kg) i TAA (300 mg/kg) su administrirane tokom tri uzastopna dana, a u FIN+TAA₉₀₀ grupi FIN je primenjen 2 h pre svake doze TAA. Uzorci mozga za analizu su uzeti 24 h nakon primene poslednje doze TAA. Ekspresija subjedinica je određivana korišćenjem poliklonalnih zečjih anti-p67-phox (1:500), anti-p47-phox (1:500), anti-p40-phox (1:500) i anti-p22-phox (1:500) antitela. Nakon inkubacije sa primarnim antitelima membrane su inkubirane sa sekundarnim anti-zečjim (1:2000) antitelima obeleženim peroksidazom rena. Statistička značajnost razlike je procenjena korišćenjem jednostruke ANOVE sa Fišerovim (Fisher) *post hoc* testom (**p*<0,05 i ***p*<0,01 u odnosu na kontrolu).



Grafikon 4.19. Uticaj finasterida (FIN) i tioacetamida (TAA) na nivo malondialdehida (MDA)(A) i aktivnost superoksid dizmutaze (SOD)(B) u moždanim strukturama pacova. Dnevne doze FIN (50 mg/kg) i TAA (300 mg/kg) su administrirane tokom tri uzastopna dana, a u FIN+TAA₉₀₀ grupi FIN je primenjen 2 h pre svake doze TAA. Uzorci mozga za analizu su uzeti 24 h nakon primene poslednje doze TAA. Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem jednostruke ANOVE sa Fišerovim (Fisher) *post hoc* testom (* $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,01$ u odnosu na TAA₉₀₀ grupu).



Grafikon 4.20. Uticaj finasterida (FIN) i tioacetamida (TAA) na ekspresiju SOD1 i SOD2 u korteksu (A) i hpokampusu (B) pacova. Ekspresija SOD1 i SOD2 je određivana korišćenjem poliklonskih kozjih anti-SOD1 (1:500) i anti-SOD2 (1:500) antitela. Nakon inkubacije sa primarnim antitelima membrane su inkubirane sa sekundarnim anti-kozjim (1:2000) antitelima obeleženim peroksidazom rena.

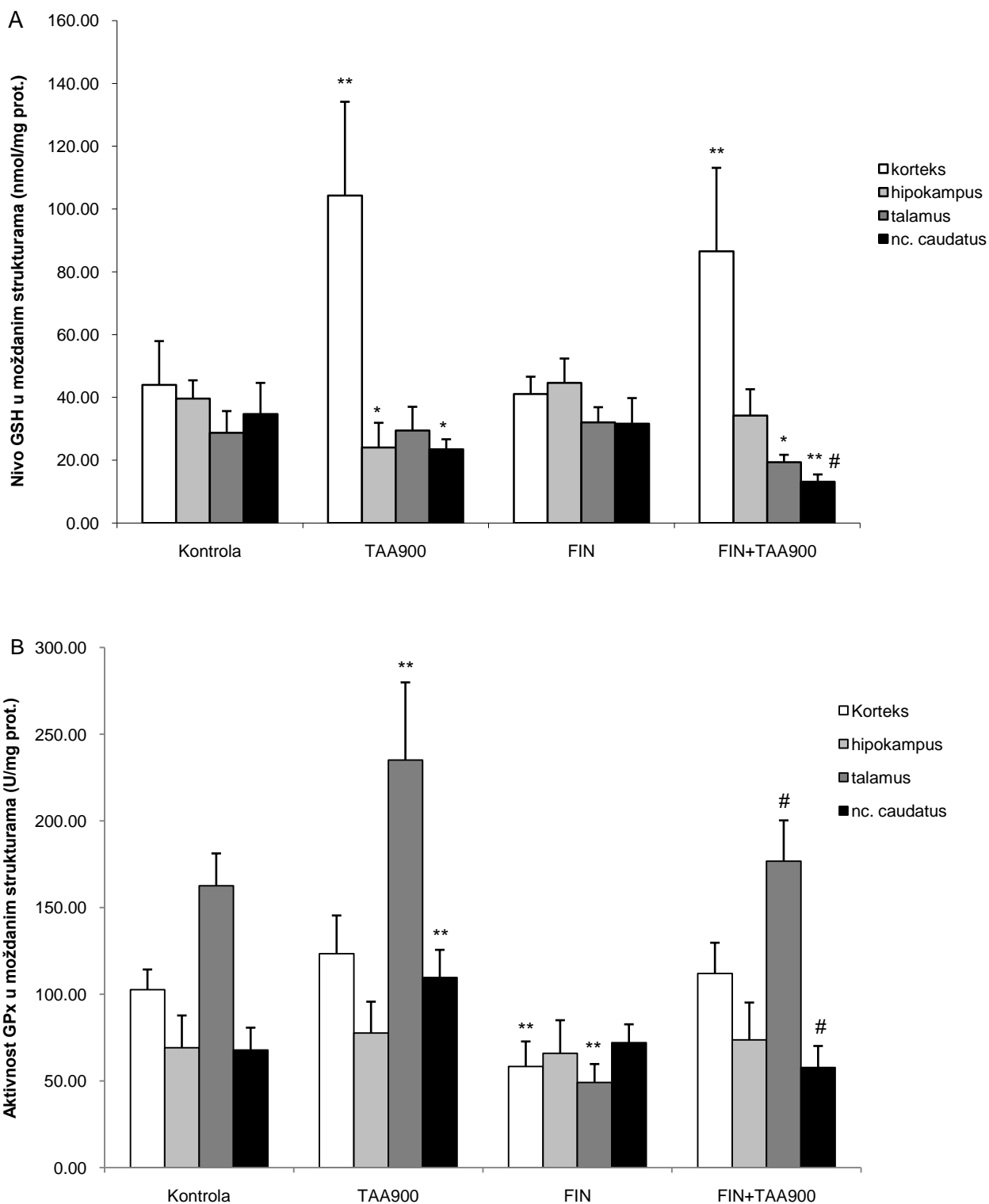
Statistička značajnost razlike je procenjena korišćenjem jednostruke ANOVE sa Fišerovim (Fisher) *post hoc* testom (* $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,01$ u odnosu na TAA₉₀₀ grupu, † $p < 0,01$ u odnosu na FIN grupu).

Nivo GSH je bio značajno viši u korteksu životinja tretiranih TAA-om ($104,29 \pm 29,87$ nmol/mg prot.) u odnosu na kontrolnu grupu ($43,98 \pm 13,94$ nmol/mg prot.) ($p < 0,01$), dok je nivo GSH u hipokampusu ($24,05 \pm 7,84$ nmol/mg prot.) ($p < 0,05$) i *nc. caudatusu* ($23,46 \pm 3,19$ nmol/mg prot.) ($p < 0,05$) je bio značajno niži u TAA₉₀₀ u poređenju sa kontrolnom grupom ($39,67 \pm 5,76$ nmol/mg prot. i $34,70 \pm 9,91$ nmol/mg prot. u hipokampusu i *nc. caudatusu*). Slično kao u TAA₉₀₀ grupi, nivo GSH u korteksu ($86,52 \pm 26,60$ nmol/mg prot.) ($p < 0,01$) je bio značajno viši, a u *nc. caudatusu* ($13,18 \pm 2,26$ nmol/mg prot.) ($p < 0,01$) značajno niži u FIN+TAA₉₀₀ grupi u odnosu na kontrolu 24 h nakon primene poslednje doze TAA. Takođe, nivo GSH u *nc. caudatusu* je bio značajno niži u FIN+TAA₉₀₀ u poređenju sa TAA₉₀₀ grupom ($p < 0,01$), dok se u korteksu nivo GSH nije značajno razlikovao između FIN+TAA₉₀₀ i TAA₉₀₀ grupe ($p > 0,05$). Dok sam TAA nije uzrokovao promenu nivoa GSH u talamusu, nivo GSH u ovom regionu je bio značajno niži u FIN+TAA₉₀₀ grupi ($19,37 \pm 2,33$ nmol/mg prot.) ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolom ($28,76 \pm 6,87$ nmol/mg prot.) U hipokampusu životinja iz FIN+TAA₉₀₀ grupe nije uočena značajna razlika u nivou GSH u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$). Sam FIN nije izazvao značajnu promenu nivoa GSH u poređenju sa kontrolom ni u jednoj moždanoj strukturi ($p > 0,05$; Grafikon 4.21A).

Aktivnost GPx je bila značajno viša u talamusu ($235,09 \pm 44,91$ U/mg prot.) ($p < 0,01$) i *nc. caudatusu* ($109,61 \pm 16,11$ U/mg prot.) ($p < 0,01$) životinja iz TAA₉₀₀ grupe u odnosu na kontrolu ($162,61 \pm 18,72$ U/mg prot. i $67,85 \pm 12,97$ U/mg prot. u talamusu i *nc. caudatusu*). Iako je postojala tendencija rasta aktivnosti ovog enzima u korteksu i hipokampusu, u ovim strukturama TAA nije izazvao značajnu promenu aktivnosti GPx u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$). S druge strane, FIN je izazvao pad aktivnosti GPx u korteksu ($58,38 \pm 14,48$ U/mg prot.) ($p < 0,01$) i talamusu ($49,17 \pm 10,67$ U/mg prot.) ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolu. Aktivnost ovog enzima se nije razlikovala ni u jednoj ispitivanoj moždanoj strukturi u FIN+TAA₉₀₀ grupi u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$), ali je aktivnost GPx u talamusu ($176,71 \pm 23,68$ U/mg prot.) ($p < 0,01$) i *nc. caudatusu* ($57,82 \pm 12,43$ U/mg prot.) ($p < 0,01$) bila značajno niža u FIN+TAA₉₀₀ grupi u poređenju sa TAA₉₀₀ grupom (Grafikon 4.21B).

Iako je aktivnost GR pokazivala tendenciju porasta u svim moždanim strukturama u TAA₉₀₀ grupi, TAA je izazvao značajan porast aktivnosti ovog enzima jedino u korteksu ($9,74 \pm 1,52$ U/mg prot.) u poređenju sa kontrolnom grupom ($6,23 \pm 2,06$ U/mg prot.)($p < 0,05$). Aktivnost GR se nije značajno razlikovala ni u jednoj moždanoj strukturi životinja iz FIN+TAA₉₀₀ grupe u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$). Međutim, aktivnost ovog enzima u korteksu ($6,37 \pm 2,55$ U/mg prot.)($p < 0,05$), hipokampusu ($10,61 \pm 0,87$ U/mg prot.)($p < 0,05$) i talamusu ($7,44 \pm 2,42$ U/mg prot.)($p < 0,05$) je bila značajno niža u FIN+TAA₉₀₀ u poređenju sa TAA₉₀₀ grupom 24 h nakon tretmana. Sam FIN nije izazvao značajnu promenu aktivnosti ovog enzima u odnosu na kontrolu ni u jednoj moždanoj strukturi (Grafikon 4.22A).

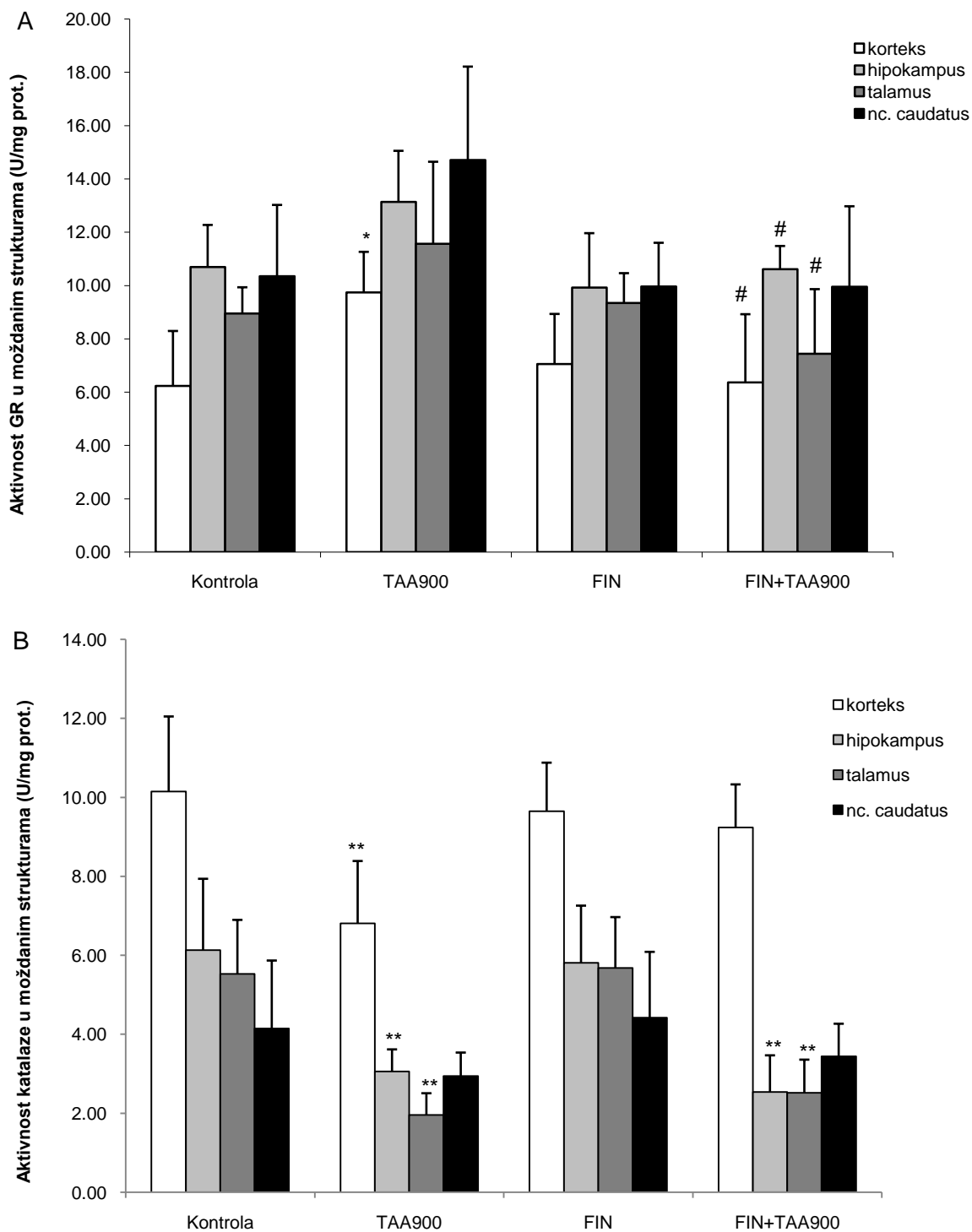
Dok FIN nije izazvao značajne promene aktivnosti katalaze, aktivnost ovog enzima u korteksu ($6,81 \pm 1,58$ U/mg prot.)($p < 0,01$), hipokampusu ($3,06 \pm 0,56$ U/mg prot.)($p < 0,01$) i talamusu ($1,96 \pm 0,55$ U/mg prot.)($p < 0,01$) je bila značajno niža u TAA₉₀₀ u odnosu na kontrolnu grupu. U *nc. caudatusu* nije uočena značajna razlika u aktivnosti ovog enzima između TAA₉₀₀ ($2,94 \pm 0,60$ U/mg prot.) i kontrolne grupe ($4,15 \pm 1,72$ U/mg prot.)($p > 0,05$). S druge strane, aktivnost katalaze je bila značajno niža u hipokampusu ($2,54 \pm 0,93$ U/mg prot.)($p < 0,01$) i talamusu ($2,52 \pm 0,84$ U/mg prot.)($p < 0,01$) životinja iz FIN+TAA₉₀₀ grupe u odnosu na kontrolu ($6,13 \pm 1,81$ U/mg prot. i $5,53 \pm 1,37$ U/mg prot.), dok se aktivnost katalaze u korteksu i *nc. caudatusu* nije značajno razlikovala između FIN+TAA₉₀₀ i kontrolne grupe ($p > 0,05$). Ni u jednoj strukturi nije uočena značajna razlika u aktivnosti ovog enzima između FIN+TAA₉₀₀ i TAA₉₀₀ grupe 24h nakon tretmana ($p > 0,05$; Grafikon 4.22B).



Grafikon 4.21. Uticaj finasterida (FIN) i tioacetamida (TAA) na nivo redukovanog glutationa (GSH)(A) i aktivnost glutation peroksidaze (GPx)(B) u moždanim strukturama pacova.

Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem jednostruke ANOVE sa Fišerovim (Fisher) *post hoc* testom (* $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,01$ u odnosu na TAA₉₀₀ grupu).

Za detaljnije informacije videti grafikon 4.19.



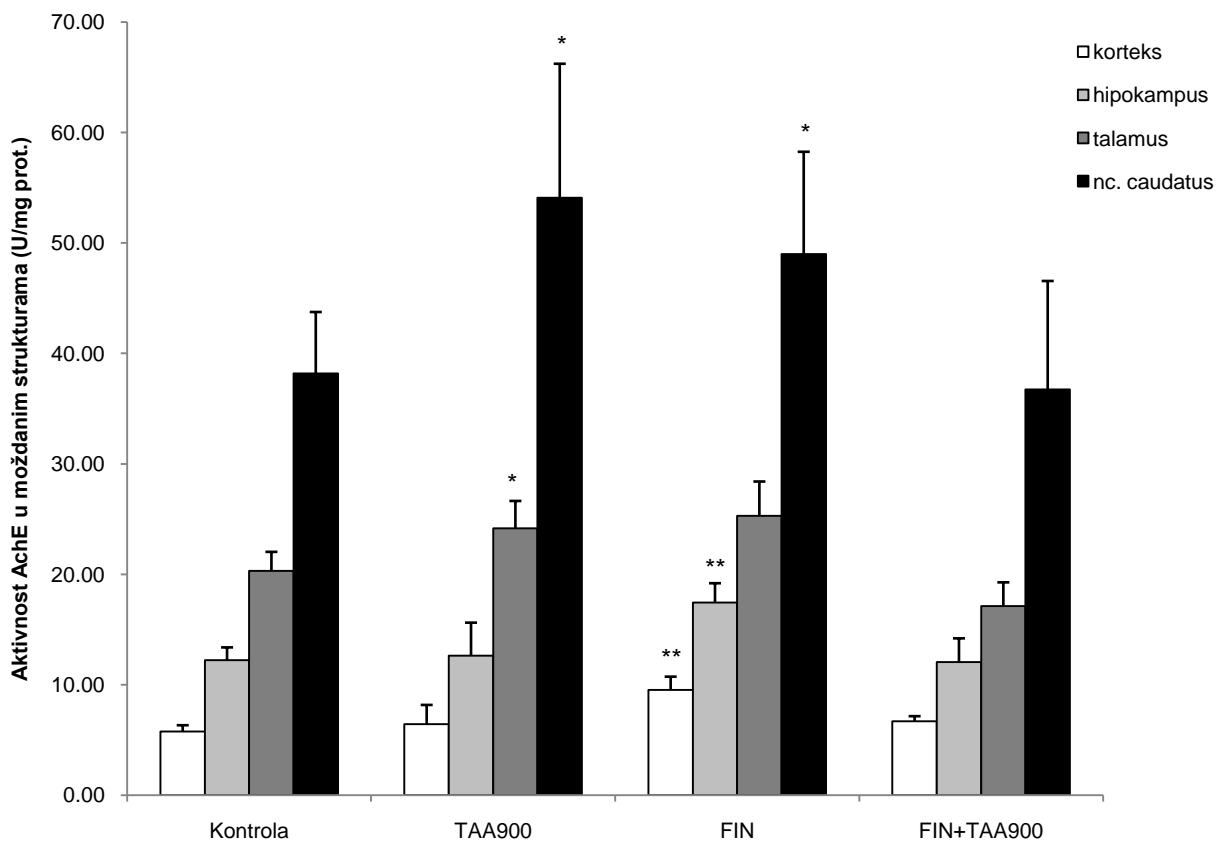
Grafikon 4.22. Uticaj finasterida (FIN) i tioacetamida (TAA) na aktivnost glutation reduktaze (GR)(A) i katalaze (B) u moždanim strukturama pacova. Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem jednostruke ANOVE sa Fišerovim (Fisher) *post hoc* testom (* $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$ u odnosu na TAA₉₀₀ grupu). Za detaljnije informacije videti grafikon 4.19.

4.2.4. Uticaj finasterida i TAA na aktivnost acetilholinesteraze

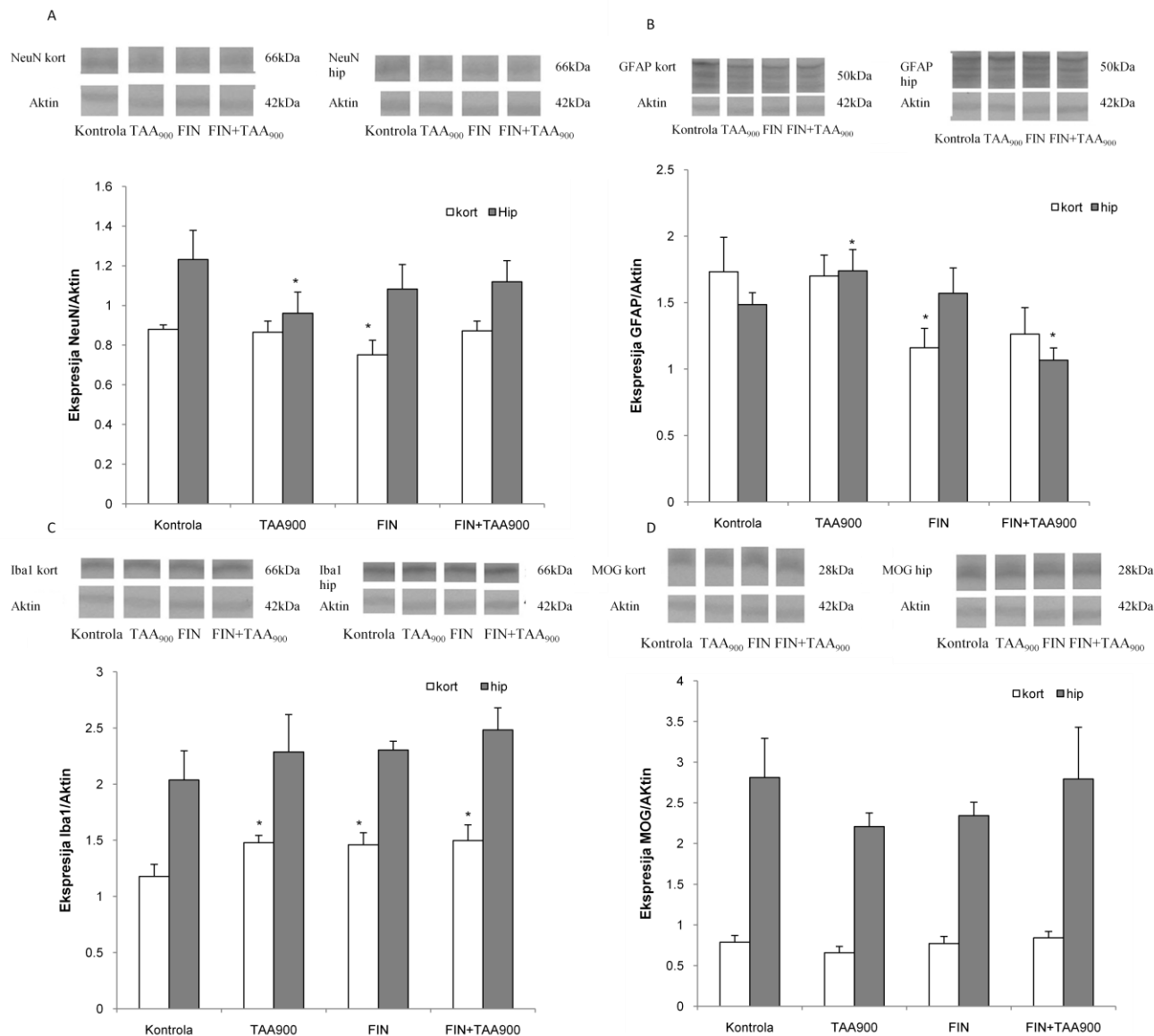
TAA je izazvao značajan porast aktivnosti AchE u talamusu ($24,16 \pm 2,47$ U/mg prot.) ($p < 0,05$) i *nc. caudatusu* ($54,10 \pm 12,12$ U/mg prot.) ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnom grupom 24 h nakon primene poslednje doze ($20,31 \pm 1,71$ U/mg prot. i $38,20 \pm 5,54$ U/mg prot. u talamusu i *nc. caudatusu*). S druge strane, u korteksu i hipokampusu nije bilo značajne promene u aktivnosti ovog enzima u TAA₉₀₀ grupi u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$). Iako je sam FIN izazvao porast aktivnosti AchE u korteksu ($9,53 \pm 1,19$ U/mg prot.) ($p < 0,01$), hipokampusu ($17,44 \pm 1,74$ U/mg prot.) ($p < 0,01$) i *nc. caudatusu* ($48,98 \pm 9,27$ U/mg prot.) ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu, u FIN+TAA₉₀₀ grupi aktivnost ovog enzima se nije značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu grupu u ispitivanim moždanim strukturama ($p > 0,05$; Grafikon 4.23).

4.2.5. Čelijski markeri u mozgu

Ekspresija NeuN je bila značajno niža u korteksu životinja iz FIN grupe i u hipokampusu životinja iz TAA₉₀₀ grupe u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$; Grafikon 4.24A). Ekspresija GFAP u korteksu je bila značajno niža u FIN u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$), dok se u drugim eksperimentalnim grupama kortikalna ekspresija GFAP nije značajno razlikovala u odnosu na kontrolu. Za razliku od korteksa, ekspresija GFAP je bila značajno viša u TAA₉₀₀ ($p < 0,05$) i značajno niža u FIN+TAA₉₀₀ grupi ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolom (Grafikon 4.24B). Dok FIN i TAA pojedinačno i u kombinaciji nisu izazvali značajne promene u ekspresiji Iba1 u hipokampusu, kortikalna ekspresija Iba1 je bila značajno viša u TAA₉₀₀, FIN i FIN+TAA₉₀₀ grupama u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$; Grafikon 4.24C). Ekspresija MOG se nije značajno razlikovala u korteksu i hipokampusu eksperimentalnih životinja u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$; Grafikon 4.24D).



Grafikon 4.23. Uticaj finasterida (FIN) i tioacetamida (TAA) na aktivnost acetilholinesteraze (AChE) u moždanim strukturama pacova. Uzorci mozga za analizu su uzeti 24 h nakon primene poslednje doze TAA. Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem jednostruke ANOVE sa Fišerovim (Fisher) *post hoc* testom (* $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu). Za detaljnije informacije videti grafikon 4.19.



Grafikon 4.24. Uticaj finasterida (FIN) i tioacetamida (TAA) na ekspresiju ćelijskih markera neurona (NeuN) (A), astrocита (GFAP) (B), mikroglije (Iba1) (C) i oligodendrocita (MOG) (D) u korteksu (kort) i hipokampusu (hip) pacova. Ekspresija markera je određivana 24 h nakon tretmana korišćenjem monoklonskih mišjih anti-NeuN (1:1000), poliklonskih zečjih anti-GFAP (1:2000), poliklonskih kozjih anti-Iba1 (1:250) i monoklonskih mišjih anti-MOG (1:1000) primarnih antitela. Nakon inkubacije sa primarnim antitelima membrane su inkubirane sa sekundarnim anti-zečjim (1:2000), anti-kozjim (1:2000) ili anti-mišjim (1:2000) antitelima obeleženim peroksidazom rena.

Statistička značajnost razlike je procenjena korišćenjem jednostruke ANOVE sa Fišerovim (Fisher) *post hoc* testom (* $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu).

Za detaljnije informacije videti grafikon 4.18.

5.DISKUSIJA

Klinička slika i EEG analiza uz potvrdu oštećenja jetre predstavljaju osnovu dijagnoze HE. Patohistološka analiza (Slika 4.1) i koncentracija amonijaka u plazmi (Grafikon 4.1A) su potvrdile da se TAA može koristiti za indukciju akutne insuficijencije jetre. Fokalna krvarenja u nekrotičnim zonama uočena u TAA₉₀₀ grupi su nađena i u drugim modelima toksičnih hepatitisa (219).

U prethodnim studijama korišćene su različite skale za klasifikaciju EEG promena u HE u humanoј populaciji. Prva klasifikacija se zasnivala na kvalitativnoj vizuelnoj analizi EEG-a (220). Prema ovoj klasifikaciji lošu prognozu sa povećanom smrtnošću u jednogodišnjem periodu imaju pacijenti sa alfa ritmom prekinutim pojedinačnim teta talasima, kao i pacijenti sa osnovnom difuznom teta aktivnošću uz povremenu pojavu visokovoltaznih delta talasa. Najgoru prognozu imaju pacijenti sa dezorganizovanom električnom aktivnošću mozga sa difuznim asinhronim teta i delta ritmom (21). Naši rezultati su u skladu sa ovim nalazima, s obzirom da je najveća smrtnost (50%) bila udružena sa porastom zastupljenosti delta talasa u TAA₉₀₀ grupi (Tabela 4.5). Međutim, ova klasifikacija nije pouzdana, jer nosi rizik subjektivne interpretacije nalaza (21).

U cilju poboljšanja reproducibilnosti van der Rijt i sar. (18) su uveli spektralnu analizu kao metodu tumačenja EEG-a. Pored reproducibilnosti spektralna analiza omogućava utvrđivanje parametara koji korelišu sa kliničkom slikom i prognozom HE (23). Spektralnom analizom EEG promene se mogu klasifikovati prema srednjoj dominantnoj frekvenciji i relativnoj zastupljenosti teta i delta talasa. Najteži stadijum HE se karakteriše srednjom dominantnom frekvencijom ≤ 3 Hz i zastupljenošću delta talasa $\geq 45\%$ (16–18). Iako se klasifikacija po van der Rijtu (18) može koristiti u humanoј populaciji, ona nije pogodna za evaluaciju EEG promena u HE izazvanoj TAA-om, s obzirom da je u svim grupama tretiranim TAA-om zastupljenost delta talasa bila veća od 45% (Tabela 4.5). Odgovarajuća klasifikacija za ovaj model bi trebalo da uključi i voltažu delta talasa.

Na modelu HE izazvanom TAA-om bihevioralne i EEG promene ne korelišu precizno sa koncentracijom amonijaka u plazmi, što ukazuje na uticaj drugih toksina u patogenezi HE, kao i na moguće direktno neurotoksično dejstvo TAA (221). U mozgu se nalazi izoenzim citohrom P450-zavisne monooksigenaze koji metaboliše TAA u neurotoksične metabolite, koji potencijalno mogu doprinositi patogenezi encefalopatije

(221,222). Sinteza ovih metabolita je potvrđena u mozgu pacova nakon intraperitonealne primene TAA (222), ali ne i nakon unosa TAA *per os* (223). Međutim, kako je TAA izazvao bihevioralne i EEG promene na dozno-zavistan način, analiza ponašanja životinja i spektralna analiza EEG-a ostaju pogodne metode za praćenje toka HE izazvane TAA-om. Hipotermija, jedan od faktora koji može doprinositi razvoju encefalopatije u intoksikaciji TAA-om nije uočena u našoj studiji (Grafikon 4.1B).

Iako TAA u dozi od 300 mg/kg nije izazvao značajne bihevioralne promene (Tabela 4.1), EEG analiza je potvrdila razvoj početne HE. Ova doza TAA je izazvala porast srednje voltaže na EEG-u, koji je pre svega izražen u beta i alfa opsegu (Tabele 4.2 i 4.3), dok je u teta opsegu porast voltaže uočen jedino 23,5 h nakon primene TAA (Tabela 4.4). Blaga HE u humanoju populaciji je praćena sličnim promenama u voltaži EEG talasa, što se može objasniti povećanom GABA-ergičkom i glutamatergičkom aktivnošću u akutnoj HE (15,224). Primena malih doza benzodijazepina povećava voltažu beta talasa u prednjim delovima korteksa, dok se sa povećanjem doze električna aktivnost mozga usporava sa pojavom alfa talasa (15). S druge strane, početne promene u zastupljenosti EEG talasa variraju u humanoju populaciji. Dok neke studije naglašavaju dominaciju alfa talasa u frontalnim režnjevima (225,226), druge studije (21,227) ukazuju na porast zastupljenosti beta talasa u blagoj HE (Tabela 4.2). Takođe, neke studije opisuju i niskovoltaznu beta aktivnost u početnim stadijumima HE kod ljudi (227). U našoj studiji uočen je porast zastupljenosti alfa i pad zastupljenosti beta talasa u blagoj HE izazvanoj TAA-om.

Za razliku od 300 mg/kg, TAA je u dozi od 600 mg/kg izazvao pad ukupne OBT kod pacova (Tabela 4.1). Međutim, nisu svi bihevioralni testovi podjednako osetljivi na dejstvo TAA. Dok su vitalni refleksi bili očuvani kod većine životinja (80%)(Grafikon 4.2), TAA u dozi od 600 mg/kg je izazvao smanjenje opšte motorne aktivnosti i eksplorativnog ponašanja pacova, sa daljim progresivnim smanjenjem i gubitkom spontane motorne aktivnosti nakon primene 900 mg/kg TAA (Grafikon 4.4A i B). Kako bradikinezija, hiperrefleksija, lepršajući tremor, često udruženi sa rigidnošću, predstavljaju najčešće motorne manifestacije HE u humanoju populaciji (228), ovo ukazuje da se TAA u dozi od 600 mg/kg može koristiti za ispitivanje patogeneze motornih promena u HE.

Osim motorne aktivnosti, TAA je izazvao slabljenje refleksnih trzaja glave i auditivnog refleksa na dozno-zavistan način (Grafikon 4.3A). Ovo slabljenje pratilo je i otežano izvođenje ekvilibrijumskog testa i refleksa postavljanja (Grafikon 4.3B). Dok refleksni trzaji glave i auditivni refleks nisu progresivno slabili u periodu od 6-24 h nakon primene druge doze TAA u TAA₆₀₀ grupi, izvođenje ekvilibrijumskog testa i refleksa postavljanja se dodatno pogoršavalo u ovom periodu. Ovo ukazuje da ekvilibrijumski test i refleks postavljanja imaju poseban značaj u praćenju progresije HE izazvane TAA-om, dok u ranoj fazi HE ovi testovi nemaju nikakvu prednost u dijagnozi motornih promena u odnosu na refleksne trzaje glave i auditivni refleks.

TAA se može koristiti i za indukciju ciroze jetre i tipa C HE sa izraženim kognitivnim poremećajima, a bez izražene anksioznosti (148,229). Na ovom modelu nije uočena promena lokomotorne aktivnosti i eksplorativnog ponašanja pacova (148), što ukazuje da se bihevioralne karakteristike akutne i hronične HE izazvane TAA-om razlikuju, sa izraženim motornim promenama u akutnoj i dominacijom kognitivnih poremećaja u hroničnoj HE.

Najraniji EEG znak pogoršanja HE u TAA₆₀₀ grupi praćen razvojem kome i smrtnim ishodom (letalitet 10%) je bio porast voltaže delta talasa (Tabela 4.5). Porast voltaže alfa i teta talasa je uočen jedino 23,5 h nakon primene poslednje doze TAA, a beta talasa 23 i 23,5 h nakon tretmana (Tabele 4.2, 4.3 i 4.4). Iako je zastupljenost delta talasa bila niža, a teta talasa značajno viša 22,5 h nakon tretmana, ovi parametri nemaju prognostičku vrednost, zato što ove promene kasnije nisu bile uočljive, iako je koma bila prisutna. Ovo ukazuje da je prvi EEG znak pogoršanja HE izazvane TAA-om povećanje voltaže delta talasa, a ne promena zastupljenosti pojedinih EEG talasa.

Vitalni refleksi (kornealni refleks, refleksi uklanjanja, hvatanja i uspravljanja) su se istovremeno menjali, a značajno smanjenje ovih refleksa je uočeno kod 75% životinja nakon primene TAA u dozi od 900 mg/kg 2 h nakon tretmana (Grafikon 4.2). Gubitak vitalnih refleksa sa auditivnim refleksom i refleksnim trzajima glave definiše komu kod pacova i odgovara najtežem stadijumu HE (stadijum IV)(204). Na razvoj kome u TAA₉₀₀ grupi ukazuju i EEG promene. Hepatična koma u humanoј populaciji je udružena sa različitim promenama na EEG-u, od alfa ritma sa povremenom pojavom teta talasa u

početnoj komi do difuzne pojave teta i delta talasa u terminalnoj komi. Trifazični talasi mogu biti prisutni, ali nisu uvek uočljivi (230). Terminalna koma se karakteriše zaravnjenjem EEG-a sa dominacijom delta talasa (231). HE izazvana galaktozaminom i podvezivanjem hepatične arterije kod pacova se takođe karakteriše niskofrekventnom EEG aktivnošću (232). Slični nalazi su nađeni i kod hepatektomisanih svinja sa fulminantnom insuficijencijom jetre (146). Kako je i u našoj studiji gubitak vitalnih refleksa bio udružen sa smanjenjem voltaže EEG-a uz izraženiju dominaciju delta talasa nakon primene TAA u dozi od 900 mg/kg (Grafikon 4.2 i tabela 4.5), EEG analiza i analiza ponašanja ukazuju da je ova doza TAA pogodna za ispitivanje patogenetskih mehanizama hepatične kome.

Dok je u našoj studiji hepatičnu komu izazvao TAA u dozi od 900 mg/kg u periodu od 24 h, druge studije su ustanovile razvoj kome tek 64 h nakon tretmana većim dozama TAA (1200 mg/kg)(204). Ova razlika se može objasniti različitim metabolizmom TAA u različitim modelima. TAA se metaboliše u jetri u TAA-S-oksidi pod uticajem citohrom P450-zavisne monooksigenaze (233,234). U sledećem koraku TAA-S-oksidi se pretvara u acetamid i polarne produkte, koji se kovalentno i ireverzibilno vezuju za različite makromolekule u hepatocitima, dovodeći do njihove nekroze (233). Kako su citohrom P450-zavisne monooksigenaze inducibilni enzimi, može se pretpostaviti da tri pojedinačne doze TAA od 300 mg/kg primenjene u našoj studiji uzrokuju veću produkciju citotoksičnih metabolita u jetri od dve doze od po 600 mg/kg (204). Povećana produkcija citotoksičnih metabolita može takođe biti uzrok brže pojave ostalih bihejvioralnih promena u našoj studiji u odnosu na druge (204).

Kvantitativna EEG analiza je pokazala porast zastupljenosti teta talasa u zadnjim odvodima kod 15-30% pacijenata sa cirozom jetre (23). Naši rezultati ne korelišu precizno sa ovim nalazima, najverovatnije zbog toga što TAA izaziva akutnu insuficijenciju, a ne cirozu jetre i zbog mogućih direktnih neurotoksičnih efekata TAA.

Brojne eksperimentalne studije su pokazale različitu osetljivost životinjskih vrsta na efekte TAA. Baterijom testova SHIRPA je pokazano da TAA u dozi od 600 mg/kg izaziva značajne motorne i kognitivne poremećaje kod C57BL/6 miševa (235), dok su znatno niže doze TAA (200 mg/kg) dovoljne da izazovu motorne promene kod miševa Sabra soja (236). Nasuprot ovome, doza TAA od 1200 mg/kg je neophodna za razvoj motornih

promena kod Sprague-Dawley pacova (204). Ova doza nije pogodna za indukciju akutne insuficijencije jetre kod Wistar pacova, s obzirom da je već doza od 900 mg/kg uzrokovala visok mortalitet (50%) u našoj studiji.

Poznato je da oksidacijski stres ima važnu ulogu u patogenezi HE izazvanoj TAA-om. Uočeno je da je nivo MDA u nesinaptičkim mitohondrijama kortikalnih neurona povišen 12 h nakon primene TAA, kao i da se antioksidacijski kapacitet mozga smanjuje (237). Takođe, antioksidansi kao što su vitamin E, L-karnitin i melatonin smanjuju hiperamonijemiju i lipidnu peroksidaciju u mozgu i sprečavaju smanjenje antioksidacijskog kapaciteta neurona nakon izlaganja TAA (238). TAA inhibiše komplekse I i III respiracijskog lanca i piruvat dehidrogenazu u mitohondrijama, što doprinosi stvaranju slobodnih radikala i mitohondrijskoj disfunkciji (239). Slobodni radikali potencijalno doprinose smanjenju aktivnosti Na^+/K^+ ATP-aze u mozgu (237).

Naši rezultati takođe potvrđuju ulogu oksidacijskog stresa u patogenezi HE. Međutim, iako je TAA izazvao lipidnu peroksidaciju u mozgu na dozno-zavistan način, naša studija je pokazala da nisu sve moždane strukture podjednako osetljive na oksidacijski stres. Moždano stablo je osetljivije od korteksa i hipokampusa, dok je talamus najmanje osetljiv na lipidnu peroksidaciju. Dok je 300 mg/kg TAA bilo dovoljno da izazove lipidnu peroksidaciju u moždanom stablu (Grafikon 4.7A), čak ni doza od 900 mg/kg nije bila dovoljna da izazove peroksidaciju lipida u talamusu (Grafikon 4.19A). Iako su i ranije studije pokazale različitu osetljivost moždanih struktura na oksidacijski stres, rezultati su delimično kontradiktorni. Dok su neke studije utvrdile veću osetljivost ponsa, produžene moždine i moždanog korteksa na oksidacijski stres izazvan TAA-om od cerebeluma (240), *in vitro* studije su pokazale da su cerebelarne granularne ćelije i CA1 neuroni hipokampusa osetljiviji na oksidacijsko oštećenje parakvatom od kortikalnih i CA3 neurona hipokampusa (241). Ovo ukazuje da osim unutrašnjih svojstava samih neurona, supstanca korišćena u modelu određuje stepen oksidacijskog oštećenja pojedinih moždanih struktura. Selektivna vulnerabilnost neurona na oksidacijsko oštećenje je uočena i u Alchajmerovoj (Alzheimer) bolesti (242,243), Parkinsonovoj bolesti (244) i amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi (245). Prema našoj studiji u patogenezi HE izazvane TAA-om oksidacijski stres je potencijalno važniji u moždanom stablu i korteksu nego u hipokampusu i talamusu.

Mehanizmi različite osetljivosti moždanih regiona na oksidacijski stres su brojni i uključuju: različitu brzinu metabolizma TAA u pojedinim regionima, različite koncentracije gvožđa, različitu ekspresiju antioksidacijskih enzima i gena uključenih u oksidacijski metabolizam, reparaciju DNK, obradu RNK transkripta i aktivaciju različitih signalnih puteva (241). Naša studija takođe potvrđuje da regionalne razlike u aktivnosti antioksidacijskih enzima mogu doprinosti različitoj osetljivosti pojedinih moždanih struktura na oksidacijsko oštećenje. GPx predstavlja potencijalno najvažniji antioksidacijski enzim, koji određuje otpornost talamusa na oksidacijsko oštećenje izazvano TAA-om, s obzirom da je, kako u bazalnim uslovima, tako i nakon primene 900 mg/kg TAA aktivnost ovog enzima bila najviša u talamusu (Grafikon 4.21B). Porast aktivnosti GPx nakon primene TAA može predstavljati adaptacioni odgovor talamusa na povećano stvaranje slobodnih radikala. Kao posledica veće aktivnosti GPx nivo GSH u talamusu je bio niži u odnosu na ostale ispitivane strukture u bazalnim uslovima. Međutim, nivo GSH se nije dodatno smanjivao nakon primene TAA (Grafikon 4.21A). Aktivnost SOD u talamusu je takođe bila viša u odnosu na korteks i *nc. caudatus*, ali ovaj enzim najverovatnije nema tako važnu ulogu u odbrani talamusa od oksidacijskog oštećenja, s obzirom da primena TAA nije izazvala značajnu promenu aktivnosti ovog enzima (Grafikon 4.19B).

U korteksu TAA u dozi od 300 mg/kg nije izazvao lipidnu peroksidaciju, što se bar delimično može objasniti porastom aktivnosti katalaze u ovom regionu (Grafikon 4.6A i B). Aktivnost katalaze je i u bazalnim uslovima viša u korteksu u odnosu na ostale ispitivane regione (Grafikon 4.22B), što dodatno ukazuje na važnu ulogu ovog enzima u zaštiti od oksidacijskog oštećenja kortikalnih neurona. Međutim, sa povećanjem doze TAA, lipidna peroksidacija u korteksu je rasla (Grafikon 4.6A), što može biti posledica povećanog stvaranja ili smanjene neutralizacije slobodnih radikala.

Važan enzim u stvaranju slobodnih radikala u HE je NADPH oksidaza. Na modelu ciroze jetre izazvanom podvezivanjem hloedohusa ustanovljen je porast ekspresije NADPH oksidaze u korteksu (246), u čijoj aktivaciji važnu ulogu ima NF- κ B (120). NADPH oksidaza predstavlja multiproteinski kompleks, koji se sastoji od većeg broja membranskih i citoplazmatskih komponenti i čija aktivacija zahteva kompleksne proteinske interakcije (247). Aktivacija fagocitne NADPH oksidaze (NOX2) započinje fosforilacijom p47

subjedinice, koja uzrokuje njenu konformacionu promenu i vezivanje za membransku p22 subjedinicu (248). p47 zatim omogućava interakciju aktivacione subjedinice p67 i male p40 subjedinice sa NOX2 kompleksom (249). U završnom koraku GTP-aza Rac interreaguje sa NOX2, najpre direktno, a potom i indirektno preko p67 subjedinice (247). Ovako formirani kompleks je aktivan i prenosi elektron sa citosolnog NADPH na O₂ gradeći superoksidni anjon.

Na astrocitima u kulturi i presecima korteksa uočena je povećana ekspresija p47 subjedinice NADPH oksidaze u hiperamonijemiji kao posledica bubrenja ćelija (43,250), prekomerne aktivacije NMDA receptora (250) i nagomilavanja Ca²⁺ u neuronima (251). Nasuprot ovome, u našoj studiji uočena je smanjena ekspresija p67 u korteksu, dok je ekspresija p40 bila povećana u terminalnoj HE izazvanoj TAA-om (Grafikon 4.18B i D). Ekspresija p47 subjedinice se nije menjala nakon primene TAA (Grafikon 4.18C). Razlika između nalaza *in vitro* studija (250) i naših nalaza se može objasniti prisustvom većeg broja toksina koji *in vivo* utiču na tok HE, kao i nedovoljno razjašnjenim mehanizmom aktivacije neuronske NADPH oksidaze, čija ekspresija nije razdvojena od ekspresije fagocitne NADPH oksidaze u našoj studiji. NOX3 i NOX4 izoenzimi NADPH oksidaze su prisutni u neuronima (247). Za razliku od NOX2, aktivacija NOX3 ne zahteva prisustvo citosolnih subjedinica enzima (247), a uloga p47 i p67 u regulaciji aktivnosti NOX3 je još uvek nejasna. Iako ove subjedinice mogu da aktiviraju NOX3 (252), njihovo odsustvo ne uzrokuje nikakve fenotipske promene kod ljudi ili miševa (247). Takođe, uloga Rac još nije potpuno razjašnjena, a za aktivaciju NOX3 potrebna je NOXO1, subjedinica koja ne utiče na aktivaciju fagocitne NADPH oksidaze (253). S druge strane, za aktivaciju NOX4 nisu potrebne citosolne subjedinice (254). Upoznavanje mehanizama aktivacije ovih izoenzima NADPH oksidaze i ekspresije subjedinica odgovornih za ovu aktivaciju bi dodatno razjasnilo ulogu ovog enzima u patogenezi oksidacijskog stresa u HE.

Dodatno objašnjenje za odsustvo porasta ekspresije p47 i p67 subjedinice NADPH oksidaze u našoj studiji može biti razvoj kome nakon primene TAA u dozi od 900 mg/kg. U komi se usporavaju metabolički procesi, što može rezultovati i manjim stvaranjem slobodnih radikala. Iako naša studija ne negira ulogu NADPH oksidaze u patogenezi HE

izazvanoj TAA-om, važniju ulogu u razvoju oksidacijskog stresa u korteksu u terminalnoj HE verovatno ima smanjenje antioksidacijskog kapaciteta ćelija.

U hepaticnoj komi izazvanoj TAA-om porast lipidne peroksidacije je bio udružen sa opadanjem aktivnosti katalaze (Grafikon 4.22B). S druge strane, aktivnost drugih antioksidacijskih enzima kao što su SOD i GR je porasla u TAA₉₀₀ grupi (Grafikon 4.19B i 4.22A), dok se aktivnost GPx nije značajno promenila (Grafikon 4.21B). SOD svojom povećanom aktivnošću povećava stvaranje H₂O₂ u čijoj neutralizaciji u teškoj intoksikaciji TAA-om prema našoj studiji značajniju ulogu ima GPx od katalaze.

Uloga SOD i njenih izoenzima u vulnerabilnosti kortikalnih neurona na oksidacijski stres je nedovoljno rasvetljena. U *in vitro* studiji u kojoj je utvrđena veća osetljivost cerebelarnih granularnih ćelija na oksidacijski stres od kortikalnih neurona, nađena je 2,5 puta veća ekspresija mitohondrijskog izoenzima SOD2 u cerebelumu u odnosu na korteks u bazalnim uslovima (241). Međutim, paradoksalno veća ekspresija SOD2 u osetljivijim cerebelarnim ćelijama može se objasniti uzgajanjem ćelija u sredini sa povišenim pritiskom O₂, što je upravo moglo uzrokovati indukciju SOD2 na mestu najvećeg stvaranja slobodnih radikala. U prilog ovoj teoriji govori i činjenica da je parakvat izazvao porast SOD2 u cerebelarnim ćelijama, ali ne i u korteksu, iako je preživljavanje kortikalnih neurona bilo značajno veće (241). Ovo ukazuje da SOD ne doprinosi značajno vulnerabilnosti neurona na oksidacijski stres, već da porast aktivnosti ovog enzima predstavlja adaptacioni mehanizam neurona na povećano stvaranje slobodnih radikala.

Manje doze TAA (2x300 mg/kg) takođe izazivaju porast aktivnosti SOD u korteksu, ali istovremeno smanjuju aktivnost GPx i GR. Takođe, manje doze TAA izazivaju porast SOD2 (240) za razliku od naše studije gde je nađen porast ekspresije SOD1 u korteksu (Grafikon 4.20A). Odnos GSH/GSSG se smanjuje, dok nivo nitrita i nitrata, markera nitrozativnog stresa, raste, kako u korteksu, tako i u cerebelumu i moždanom stablu pacova nakon primene manjih doza (240). Nasuprot ovome, u našoj studiji TAA je u dozi od 900 mg/kg izazvao porast nivoa GSH u korteksu (Grafikon 4.21A), što se može objasniti adaptivnim porastom aktivnosti GR bez prateće promene aktivnosti GPx, enzima koji izaziva oksidaciju GSH.

U drugim hiperamonijemičnim stanjima nađeno je smanjenje aktivnosti MnSOD, GPx i GR (116,255), što ukazuje da izbor modela i stadijum HE utiče na aktivnost antioksidacijskih enzima u korteksu. U hroničnoj HE izazvanoj podvezivanjem holedohusa takođe je uočena lipidna peroksidacija u korteksu praćena smanjenjem aktivnosti antioksidacijskih enzima i ukupnih i neproteinskih tiola (256). Intoksikacija amonijakom izaziva porast nivoa superoksidnog anjona i pad H_2O_2 u nesinaptičkim mitohondrijama kortikalnih neurona. Porast nivoa superoksidnog anjona u izolovanoj hiperamonijemiji je posledica njegovog povećanog stvaranja tokom ćelijske respiracije i usled dejstva enzima ksantin oksidaze, dok je smanjenje nivoa H_2O_2 posledica smanjenja aktivnosti MnSOD (255).

Prethodne studije (240) i naši rezultati ukazuju da se patogeneza oksidacijskog stresa u korteksu u HE izazvanoj TAA-om razlikuje od patogeneze u encefalopatiji izazvanoj intoksikacijom amonijakom. U blažim oblicima HE izazvane TAA-om najpre se povećava aktivnost katalaze kao prva linija odbrane od oksidacijskog stresa u korteksu, da bi u umerenoj HE SOD2 (MnSOD) imala ključnu ulogu u odbrani od slobodnih radikala. U najtežim stadijumima HE udruženim sa komom povećava se aktivnost SOD1 (Cu/ZnSOD) i GR, što doprinosi porastu GSH, iako ovi enzimi ne mogu da spreče lipidnu peroksidaciju. SOD pretvara superoksidni anjon u H_2O_2 , koji sa prelaznim metalima (npr. sa gvoždem u Fentonovoj reakciji) stvara visoko reaktivni hidroksilni radikal, koji najverovatnije uzrokuje lipidnu peroksidaciju u korteksu (257). Za sprečavanje lipidne peroksidacije neophodna je indukcija GPx i katalaze, s obzirom da primena prirodnog antioksidansa C-fikocijanina izaziva porast aktivnosti ovih enzima i uz smanjenje lipidne peroksidacije smanjuje bubrenje astrocita i poboljšava tok HE (257). Razlika u patogenezi oksidacijskog stresa u korteksu u HE izazvanoj TAA-om i encefalopatiji izazvanoj intoksikacijom amonijaka se može objasniti ulogom većeg broja toksina u patogenezi HE i mogućim direktnim neurotoksičnim efektima TAA. Uloga ksantin oksidaze i nitrozativnog stresa u oksidacijskom oštećenju korteksa u HE bi dodatno objasnila ovu razliku i trebalo bi da bude predmet daljih istraživanja.

In vitro studije pokazuju da TAA izaziva promene u lipidnom sastavu i fluidnosti ćelijskih membrana u korteksu (258). Povezanost ovih promena sa oksidacijskim stresom

nije potpuno rasvetljena. TAA izaziva smanjenje nivoa holesterola, sfingomijelina i fosfatidilserina, kao i odnosa nezasićenih i zasićenih masnih kiselina u membranama kortikalnih neurona (258). Smanjenje nivoa holesterola i sfingomijelina utiče na formiranje lipidnih platformi, funkcije receptora i neurotransmitera, kao i na preuzimanje glutamata u kortikalne neurone (259). Na ovaj način, smanjenje holesterola doprinosi povećanoj osetljivosti neurona na ekscitotoksične efekte glutamata i time potencijalno na povećano stvaranje slobodnih radikala (260,261). Takođe, lipidna peroksidacija povećava fluidnost membrana, što je utvrđeno i na modelu HE izazvanom TAA-om (258,262).

TAA je u dozi od 900 mg/kg izazvao lipidnu peroksidaciju, dok je manja doza (300 mg/kg) čak redukovala nivo MDA u hipokampusu (Grafikon 4.8A). NADPH oksidaza najverovatnije ne doprinosi oksidacijskom oštećenju hipokampusu, s obzirom da je TAA u dozi od 900 mg/kg izazvao smanjenje ekspresije p22-phox, p47-phox i p67-phox subjedinice NADPH oksidaze (Grafikon 4.18A, C i D).

Relativna otpornost hipokampusu na lipidnu peroksidaciju se može bar delimično objasniti većom aktivnošću GR u odnosu na druge moždane regione u bazalnim uslovima (Grafikon 4.22A). GPx najverovatnije ne doprinosi otpornosti hipokampusu, s obzirom da je aktivnost ovog enzima niža u odnosu na talamus i korteks (Grafikon 4.21B).

Slično kao na modelu blage HE izazvane suženjem portne vene (263), rezultati naše studije ukazuju da katalaza može imati važan uticaj na oksidacijsko oštećenje hipokampusu izazvano TAA-om. Međutim, blaga i umerena HE izazvana TAA-om u dozama od 300 mg/kg i 600 mg/kg je praćena porastom aktivnosti katalaze u hipokampusu (Grafikon 4.8B), što se može objasniti adaptacionim odgovorom neurona na povećano stvaranje slobodnih radikala. S druge strane, sa povećanjem doze TAA (900 mg/kg) aktivnost katalaze u hipokampusu se smanjuje, što ukazuje da u teškoj intoksikaciji TAA-om pad aktivnosti katalaze može doprinosti oksidacijskom oštećenju hipokampusu i pogoršanju kognitivnih poremećaja u HE. Za razliku od korteksa TAA u dozi od 900 mg/kg nije izazvao značajnu promenu aktivnosti SOD i GR u hipokampusu (Grafikon 4.19B i 4.22A). Izostanak porasta aktivnosti SOD može biti značajan u ublažavanju oksidacijskog oštećenja hipokampusu, s obzirom da je zbog pada aktivnosti katalaze omogućeno nagomilavanje H_2O_2 u hipokampusu (257).

Pokazano je da N-acetilcistein, donor sulfhidrilnih grupa, ima protektivno dejstvo u encefalopatiji izazvanoj CCl₄ i paracetamolom (264). Piramidne i granularne ćelije hipokampusa su posebno bogate kreatin kinazom, čiju aktivnost moduliše redoks stanje ćelija (265). Paracetamol izaziva oksidacijski stres i inhibiše kreatin kinazu u cerebelumu i hipokampusu, dok primena N-acetilcisteina sprečava ove promene (264). Naša studija ukazuje na moguću protektivnu ulogu donora sulfhidrilnih grupa u modulaciji toka HE izazavne TAA-om, s obzirom da je TAA izazvao smanjenje nivoa GSH u hipokampusu (Grafikon 4.21A), iako aktivnost GPx i GR nije bila značajno promenjena u TAA₉₀₀ u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikoni 4.21B i 4.22A).

Blaga HE izazvana suženjem portne vene je takođe praćena lipidnom peroksidacijom u hipokampusu, ali uz smanjenje aktivnosti GPx i SOD (263). Nasuprot ovome, utvrđeno je da hronična primena TAA tokom 3 meseca izaziva cirozu jetre praćenu porastom aktivnosti SOD u hipokampusu (148). Iako oksidacijski stres doprinosi patogenezi HE u akutnoj i hroničnoj insuficijenciji jetre, ovo ukazuje da redoks stanje hipokampusa zavisi od modela HE, kao i da je profil antioksidacijskih enzima u hipokampusu različit u akutnoj i hroničnoj insuficijenciji jetre. Ova razlika potencijalno doprinosi različitim bihevioralnim promenama u akutnoj i hroničnoj HE izazvanoj TAA-om (148), ali precizniji značaj ove razlike bi trebalo da bude predmet daljih istraživanja.

Nc. caudatus je kao komponenta dorzalnog strijatuma uključen u kontrolu motorike, dok je ventralni strijaturni (*nc. accumbens*) odgovoran za nagradne efekte i motivaciono ponašanje (266). Sporije hodanje kod starijih osoba je udruženo sa atrofijom *nc. caudatusa* (267), a slične promene u ovom jedru su uočene i u prodromalnoj fazi Huntingtonove (Huntington) bolesti (268) i u multiploj sklerozi (269). Takođe je pokazano da disfunkcija *nc. caudatusa* rezultuje hiperaktivnošću orbitofrontalnog korteksa i prednjeg dela *gyrusa cinguli*, što doprinosi razvoju opsesivno-kompulzivnog poremećaja (270). Smanjena aktivnost levog *nc. caudatusa* i oslabljene veze između njega i donje frontalne vijuge su povezane sa poremećajima mišljenja u shizofreniji (271).

Disfunkcija *nc. caudatusa* i drugih bazalnih ganglija takođe doprinosi patogenezi HE. Magnetnom rezonancom je kod pacijenata sa minimalnom HE utvrđen povećan protok krvi kroz levi *globus pallidus*, putamen i talamus, dok je srednje vreme prolaska kontrasta

skraćeno u desnom *nc. caudatusu* i obostrano u talamusu (272). U akutnoj HE izazvanoj primenom valproata uočene su promene u desnom putamenu i *nc. caudatusu*, koje su se povlačile nakon prestanka primene leka (273).

Patogeneza disfunkcije *nc. caudatusa* u HE još uvek nije dovoljno rasvetljena. Još su Mousseau i sar. (274) na uzorcima mozga dobijenim nakon obdukcije pacijenata sa HE utvrdili da se broj veznih mesta za [3H] triptamin smanjuje u *nc. caudatusu* i pretpostavili da triptamin doprinosi disfunkciji ovog regiona i patogenezi HE. Kvantitativna analiza sadržaja vode u različitim moždanim regionima pacijenata sa HE je utvrdila da se za razliku od drugih regiona u *nc. caudatusu* ne razvija niskostepeni edem mozga (275). Neke studije naglašavaju ulogu mangana u disfunkciji *nc. caudatusa*, s obzirom da je najveća akumulacija mangana kod pacijenata sa hroničnom HE nađena u ovom jedru (276). Patogeneza neurotoksičnih efekata mangana nije dovoljno rasvetljena, ali se pretpostavlja da nakupljanje mangana u strijatumu doprinosi dopaminergičkoj disfunkciji i motornim poremećajima u HE (277).

Naša studija je među prvima koja sugeriše da i oksidacijsko oštećenje *nc. caudatusa* potencijalno doprinosi njegovoj disfunkciji i patogenezi motornih poremećaja. Lipidna peroksidacija u *nc. caudatusu* u TAA₉₀₀ grupi je praćena porastom aktivnosti GPx, što najverovatnije predstavlja adaptacioni odgovor na povećano stvaranje slobodnih radikala (Grafikoni 4.19A i 4.21B). Kako se aktivnost GR nije značajno menjala (Grafikon 4.22A), TAA je u terminalnoj HE izazvao smanjenje nivoa GSH u *nc. caudatusu* (Grafikon 4.21A). Ovo ukazuje da bi primena donora sulfhidrilnih grupa potencijalno ublažila oksidacijsko oštećenje *nc. caudatusa*, što bi moglo uticati na tok HE, ali ovo treba da bude predmet daljih istraživanja.

Iako su u patogenezi HE najbolje ispitane uloge poremećaja glutamatergičke i GABA-egričke transmisije (38,55,77), poremećaji holinergičke transmisije takođe mogu doprinositi razvoju HE (114). Nivo Ach u mozgu zavisi od brzine njegove sinteze i njegove razgradnje pod dejstvom enzima holin acetiltransferaze i AchE. Dok je u nekim studijama nađeno da se aktivnost AchE povećava u frontalnom korteksu pacijenata sa cirozom jetre, a aktivnost holin acetiltransferaze i butirilholinesteraze ne menja (114), druge studije nisu ustanovile promenu aktivnosti AchE u mozgu u cirozi (278). Porast aktivnosti AchE je

takođe nađen i na eksperimentalnom modelu HE izazvanom podvezivanjem holedohusa bez ili u kombinaciji sa hiperamonijemijskom dijetom (114). Međutim, sama hiperamonijemijska dijeta ne izaziva promenu aktivnosti AchE, što ukazuje da aktivnost ovog enzima ne koreliše sa stepenom hiperamonijemije i da na aktivnost AchE utiču drugi toksini koji se nakupljaju u insuficijenciji jetre (114). Na modelu ciroze jetre izazvane TAA-om pokazano je povećanje aktivnosti AchE u entorinalnom korteksu, anterodorzalnom i anteroventralnom talamusu i *nc. accumbensu*, dok je smanjenje aktivnosti ovog enzima nađeno u CA1, CA3 regionu i *gyrusu dentatusu* hipokampusa. Ove promene u aktivnosti AchE u delovima limbičkog sistema doprinose kognitivnim poremećajima i poremećajima pažnje u tipu C HE (279).

Za razliku od tipa C HE izazvane TAA-om, u akutnoj HE nisu nedvosmisleno dokazane promene aktivnosti AchE u mozgu. Dok Zarros i sar. (237) nisu našli promenu aktivnosti AchE u mozgu, Swapna i sar. (280) su ustanovili pad aktivnosti ovog enzima u korteksu nakon primene TAA. Kinetički parametri AchE u izolatima kortikalnih membrana su prema Swapni i sar. (280) takođe bili promenjeni: koncentracija supstrata pri kojoj je brzina enzimske reakcije jednaka polovini maksimalne (K_m) je bila povećana, a maksimalna brzina enzimske reakcije (V_{max}) snižena. Promene kinetičkih parametara enzima su verovatno posledica promene lipidnog sastava ćelijske membrane u HE (280). Za razliku od prethodnih, u našoj studiji utvrđen je porast aktivnosti AchE u talamusu i *nc. caudatusu* u TAA₉₀₀ grupi, dok u korteksu i hipokampusu nisu uočene promene aktivnosti ovog enzima (Grafikon 4.23). Razlika između rezultata drugih i naše studije se može objasniti primenom različitih doza TAA, što potencijalno ukazuje da stadijum HE može uticati na aktivnost AchE.

Aktivnost AchE i oksidacijski stres u mozgu su međusobno povezani. Pokazano je da produžena inhibicija AchE povećava aktivnost brojnih neurona i time smanjuje količinu ATP-a i kreatin-fosfata u njima, inhibiše oksidativnu fosforilaciju i povećava stvaranje slobodnih radikala. Nedovoljno stvaranje energije rezultuje nagomilavanjem Ca^{2+} i aktivacijom NOS, što uzrokuje sintezu NO i nitrozativno oštećenje neurona (281). Ovo ukazuje da porast AchE u talamusu nađen u našoj studiji potencijalno doprinosi njegovoj manjoj osetljivosti na oksidacijsko oštećenje (Grafikon 4.23).

Svi terapijski pristupi za poboljšanje HE imaju ograničenu efikasnost i nose sa sobom brojne neželjene efekte. Ublažavanje toka HE je prvenstveno usmereno ka izbegavanju precipitirajućih faktora i primeni agenasa koji će smanjiti proizvodnju (npr. laktuloza, antibiotici) ili povećati preuzimanje amonijaka od strane jetre (npr. L-ornitin, L-aspartat) (282,283). Antibiotici i probiotici predstavljaju važnu komponentu terapije HE, s obzirom da crevne bakterije poseduju ureazu, koja povećava sintezu amonijaka (284). Međutim, ovi vidovi terapije imaju ozbiljna neželjena dejstva. Neomicin može dovesti do gubitka sluha i bubrežne insuficijencije, a metronidazol ispoljava značajne neurotoksične efekte. Vankomicin potencira umnožavanje bakterija u crevima i povećava rizik od bakterijske rezistencije na antibiotike, koji predstavljaju obaveznu terapiju u HE (282). Alternativni vidovi lečenja pacijenata sa HE uključuju: antagoniste benzodijazepinskih receptora, aminokiseline razgranatog lanca, suplementaciju cinkom, natrijum benzoat, agoniste dopaminskih receptora, akarbozu i probiotike (282). Nove terapijske metode su usmerene ka uklanjanju amonijaka, ne samo iz jetre, već i iz drugih organa (285). Imajući u vidu ulogu poremećaja glutamatergičke transmisije u kognitivnim disfunkcijama, jedna od terapijskih strategija u HE podrazumeva i primenu antagonista fosfodiesteraze (zaprinast, sildenafil) (76). Antiinflamatorna terapija bi takođe potencijalno mogla biti korisna u poboljšanju toka HE, s obzirom na tesnu povezanost neuroinflamacije, oksidacijskog stresa i povećanja propustljivosti unutrašnje mitohondrijske membrane u patogenezi HE. Etanercept, antagonist receptora za TNF- α , i minociklin, inhibitor mikroglije, su se pokazali efikasnim u sprečavanju inflamacije i ublažavanju manifestacija HE (286).

Rasvetljavanje uloge povećane GABA-ergičke transmisije u patogenezi HE je ukazalo da bi terapija HE potencijalno mogla biti usmerena na smanjenje efekata GABA u mozgu. Antagonisti GABA_A receptora i parcijalni inverzni agonisti benzodijazepinskih receptora su dali kontradiktorne rezultate u pogledu terapijske efikasnosti u humanoj populaciji i eksperimentalnim modelima HE (38,287,288). Drugi potencijalni terapijski pristup može biti inhibicija sinteze neurosteroida u cilju sprečavanja GABA-ergičke hiperaktivnosti. Ovo je prva studija koja je ispitivala efekte FIN na tok HE.

Ova studija je jasno pokazala da FIN poboljšava motorne sposobnosti i EEG promene i sprečava nastanak najtežih formi HE sa smrtnim ishodom nakon tretmana TAA-

om. Pretretman FIN-om je ublažio smanjenje ukupne OBT u HE izazvanoj TAA-om (Tabela 4.6) i uzrokovao različite promene u izvođenju pojedinih motornih testova. Najizraženiji efekat FIN je prevencija kome kod pacova tretiranih TAA-om. Pretretman FIN-om je u potpunosti sprečio gašenje kornealnog, auditivnog refleksa, refleksa uklanjaanja i refleksnih trzajeva glave (Grafikon 4.10), što ukazuje da se FIN može koristiti u prevenciji razvoja najtežeg stadijuma HE (IV stadijum).

EEG analiza je potvrdila protektivni efekat FIN u hepaticnoj komi izazvanoj TAA-om, s obzirom da je pretretman FIN-om sprečio pad srednje ukupne voltaže talasa i uzrokovao porast voltaže delta talasa (Grafikon 4.13 i 4.17A). Dok je hepaticna koma izazvana TAA-om bila praćena smanjenjem zastupljenosti teta i povećanjem zastupljenosti delta talasa, pretretman FIN-om je doveo do reverzije ovih promena (Grafikon 4.16B i 4.17B). Takođe, FIN je izazvao povećanje voltaže alfa i beta talasa i zastupljenosti alfa talasa (Grafikoni 4.14 i 4.15A), što odgovara blažim oblicima HE u humanojoj populaciji (15). Slične promene voltaže i zastupljenosti alfa i beta talasa nađene su i u blagoj HE izazvanoj TAA-om (TAA₃₀₀ grupa).

FIN je takođe uticao na poboljšanje opšte motorne aktivnosti i eksplorativnog ponašanja 6 i 24 h nakon tretmana poslednjom dozom TAA (Grafikon 4.12A i B). Ovaj odloženi efekat FIN može se objasniti njegovim mehanizmom dejstva, s obzirom da enzimski inhibitori zahtevaju određeno vreme za svoju maksimalnu efikasnost. Tako je i porast ekspresije translokatorskog proteina uočen 24 h nakon portno-kavnog šanta kod pacova (79). Sa druge strane, poboljšanje izvođenja ekvilibrijumskog testa i refleksa postavljanja je bilo uočljivo neposredno nakon primene poslednje doze TAA (Grafikon 4.11B). Poboljšanje motornih promena u HE izazvanoj TAA-om, kao i odsustvo kome nakon pretretmana FIN-om ukazuje da FIN ima neuroprotektivno dejstvo i da se može koristiti kao potencijalno sredstvo za poboljšanje toka HE. Ipak, FIN nije omogućio kompletan oporavak motornih funkcija iz najmanje dva razloga. Prvo, porast ekspresije translokatorskog proteina u HE nije jednak u svim moždanim strukturama, što ukazuje da FIN ima selektivno dejstvo na pojedine moždane regione. Najveći porast ekspresije translokatorskog proteina uočen je u cerebelumu i ponsu, manji u talamusu, cerebralnom korteksu i hipokampusu, a najmanji u striatumu (101). Drugo, neurosteroidi na posredan

način modulišu i aktivnost serotoninskih (5-HT₃), NMDA glutamatskih, glicinskih, opioidnih i drugih receptora u CNS-u (101). Na aktivnost neuronskih krugova u frontalnom korteksu utiču GABA-ergički interneuroni čiju aktivnost regulišu ascendentni serotoninergički i adrenergički neuroni (79). Serotonin, koji se oslobađa iz neurona čija se tela nalaze u raphe jedrima, preko 5-HT₃ receptora stimulišu GABA-ergičke interneurone, koji zatim inhibišu glutamatergičke motoneurone (79,289). ALLO modulacijom GABA_A receptora utiče na aktivnost ovih neuronskih krugova. S druge strane, smanjen nivo dehidroepiandrosteron sulfata, antagonista GABA_A receptora, u mozgu u HE uzrokuje inhibiciju serotoninergičkih neurona u *raphe* jedrima, što takođe doprinosi motornim poremećajima u HE (101,290). Takođe, neurosteroidi promenom ekspresije MAO-A, enzima koji razgrađuje kateholamine, modulišu adrenergičke ulazne signale u korteksu (94). Uticaj neurosteroida na ove neurotransmitere treba da bude predmet daljih istraživanja, ali može se pretpostaviti da bi se terapijska efikasnost FIN potencijalno mogla povećati kombinacijom sa modulatorima efekata drugih neurotransmitera.

Utvrđeno je i da antagonisti GABA_A receptora dovode do bihejvioralnih promena u HE. Bikukulin, lek iz ove grupe, uzrokuje poboljšanje kognitivnih sposobnosti pacova sa hiperamonijemijom (55), dok flumazenil dovodi do povećanja spontane motorne aktivnosti na modelu akutne insuficijencije jetre uzrokovane ishemijom (291). Iako flumazenil ima pozitivno dejstvo na tok HE kod pacova, ovaj lek nije našao svoju nedvosmislenu primenu u terapiji HE u humanoju populaciji (292). Ranije studije su pokazale da flumazenil poboljšava klinički tok težih oblika HE i ubrzava EEG aktivnost sa zamenom kontinuirane delta aktivnosti difuznom pojavom teta talasa (293–295). Ove promene na EEG-u su slične promenama koje je izazvao FIN u HE izazvanoj TAA-om u našoj studiji. Međutim, kontrolisane kliničke studije su pokazale da flumazenil ne smanjuje smrtnost od HE, već da samo prolazno poboljšava tok HE kod jednog dela soporoznih pacijenata (295). Izostanak perzistentnog povoljnog uticaja flumazenila na tok HE se može objasniti odsustvom direktne modulacije aktivnosti GABA_A receptora ovim lekom, s obzirom da on jedino onemogućava efekte benzodijazepina na ovaj receptor. Stoga su za potpunu efikasnost flumazenila neophodni neurosteroidi, koji povećavaju osetljivost GABA_A receptorskog kompleksa na GABA i niske koncentracije benzodijazepina (84). Ovo jasno ukazuje da bi

terapiju HE trebalo prvenstveno usmeriti na blokadu efekata neurosteroida, a ne na blokadu GABA_A receptora. U skladu sa ovim i sa nalazima naše studije, FIN bi mogao biti bolji izbor u terapiji HE od GABA_A antagonista.

Parcijalni inverzni agonisti benzodijazepinskih receptora, kao što su Ro15-4513 i sarmazenil, imaju potvrđene povoljne efekte na tok HE, usled smanjenja modulatornog uticaja neurosteroida na GABA_A receptore (288). Studije na kulturi hipokampalnih neurona potvrđuju da Ro15-4513 smanjuje efekte neurosteroida na hloridne struje indukovane GABA_{om} na dozno-zavistan način (288). Pokazano je da Ro15-4513 u kratkom vremenskom periodu oporavlja pacove iz hepatične kome i uspostavlja refleks uspravljanja efikasnije u odnosu na flumazenil (296). Sarmazenil poboljšava tok HE i povećava srednju dominantnu frekvenciju EEG talasa kod pasa sa portno-kavnim šantom (297). Neka istraživanja su pokazala da nemaju svi parcijalni agonisti benzodijazepinskih receptora podjednake efekte na tok HE. Tako Ro15-3505, Ro15-4513 i CGS 8216 poboljšavaju HE u stadijumu III kod pacova tretiranih TAA-om, dok samo Ro15-3505 ima povoljan efekat na HE u stadijumu II (298). Ovi agonisti nisu korisni u terapiji HE kod ljudi, jer izazivaju ozbiljne neželjene efekte, kao što su konvulzije i anksioznost (84). Međutim, njihov pozitivan efekat na tok HE ukazuje da terapijski pristup treba da bude direktno usmeren na modulaciju funkcije neurosteroida, što FIN čini potencijalnim kandidatom za terapiju HE.

Mehanizmi protektivnog efekta FIN na HE nisu potpuno rasvetljeni. Iako je pretretman FIN-om ublažio patohistološke promene u jetri (Slika 4.3D), naša studija ne ukazuje na hepatoprotektivan efekat FIN, s obzirom da se koncentracija amonijaka u plazmi nije razlikovala u FIN+TAA₉₀₀ i TAA₉₀₀ grupi (Grafikon 4.9). Ovo sugeriše da FIN najverovatnije ublažava tok HE centralnim efektima, ali se ne može isključiti ni mogućnost periferne inhibicije sinteze neurosteroida kao dodatni mehanizam. Pretpostavlja se da bi FIN mogao sprečiti porast nivoa cirkulišućih neurosteroida u HE, koji mogu da prođu kroz krvno-moždanu barijeru i doprinesu efektima lokalno sintetisanih neurosteroida u mozgu (79). Na osnovu ekspresije neuronskog markera NeuN može se pretpostaviti da FIN ublažava oštećenje neurona u hipokampusu izazvano TAA-om (Grafikon 4.24A).

Iako FIN dominantno moduliše GABA-ergičku transmisiju, još jedan mogući mehanizam protektivnog dejstva FIN u HE predstavlja modulacija holinergičke transmisije.

FIN je sprečio porast aktivnosti AchE u talamusu i *nc. caudatusu* u HE izazvanoj TAA-om (Grafikon 4.23). Značaj ovog efekta FIN nije potpuno rasvetljen, ali može doprinositi modulaciji neuroinflamacije u HE (299). Pokazano je da primena inhibitora acetilholinesteraze sprečava neurodegeneraciju i porast nivoa IL-1 β u korteksu i hipokampusu nakon laparotomije pacova kombinovane sa tretmanom lipopolisaharidom (299). Primena rivastigmina, inhibitora AchE, poboljšava kognitivne sposobnosti pacova, ali ne i motornu aktivnost u insuficijenciji jetre (114).

Smanjenje oksidacijskog stresa u mozgu može biti još jedna potencijalna strategija u ublažavanju toka HE. Antioksidans kurkumin smanjuje lipidnu peroksidaciju u hipokampusu i poboljšava tok HE (263). Novija istraživanja ukazuju da hronična suplementacija omega-3 polinezasićenim masnim kiselinama iz ribljeg ulja ublažava oksidacijski stres i poboljšava kognitivne sposobnosti pacova u HE izazvanoj TAA-om (148).

U prethodnim studijama pokazano je da FIN potencijalno ublažava hiperplaziju prostate smanjenjem lipidne peroksidacije i nivoa nitrita u prostati (300), iako ovaj lek ne utiče na oksidacijsko oštećenje proteina (301). Naša studija ukazuje da FIN takođe moduliše oksidacijski stres u mozgu, ali značaj ovog efekta u potencijalnim terapijskim efektima FIN u HE nije poznat. Pretretman FIN-om je ublažio lipidnu peroksidaciju izazvanu TAA-om jedino u korteksu, dok je u talamusu nivo MDA bio čak i veći u FIN+TAA₉₀₀ nego u TAA₉₀₀ grupi (Grafikon 4.19A). Studije na ćelijama glioma su pokazale da palmitoiletanolamid redukuje lipidnu peroksidaciju, dok pretretman FIN-om ublažava ovaj efekat palmitoiletanolamida (302). Takođe, progesteron smanjuje oksidacijsko oštećenje mozga u orofacijalnoj diskineziji, efekat koji je posredovan neurosteroidima i koji se ne ispoljava nakon pretretmana FIN-om (303). Ovo ukazuje da neurosteroidi doprinose smanjenju oksidacijskog stresa u mozgu, što delimično može objasniti porast lipidne peroksidacije u talamusu nakon pretretmana FIN-om, nađen u našoj studiji.

Pogoršanje lipidne peroksidacije u talamusu nakon pretretmana FIN-om je udruženo sa padom nivoa GSH (Grafikon 4.21A). Ovo se može objasniti smanjenjem aktivnosti katalaze i GR nakon primene FIN (Grafikon 4.22A i B). FIN takođe sprečava porast

aktivnosti GPx indukovan TAA-om, što dodatno smanjuje efikasnost uklanjanja slobodnih radikala enzimom važnim za relativnu otpornost talamusa na oksidacijski stres (Grafikon 4.21B).

Uticaj FIN na lipidnu peroksidaciju u moždanim regionima postaje kompleksniji s činjenicom da FIN sprečava razvoj kome u HE izazvanoj TAA-om i time doprinosi ubrzanju metaboličkih procesa u mozgu. Takođe, uočeno je da FIN izaziva metaboličke promene u prostati, koje mogu uticati na stvaranje slobodnih radikala. FIN smanjuje ekspresiju α lanca ATP sintaze, farnezil difosfat sintaze (enzima neophodnog za sintezu holesterola i prenilaciju proteina) i fosfofruktokinaze 2/fruktozo-2,6-bifosfataze (enzima važnog u regulaciji glikolize i glukoneogeneze), a povećava ekspresiju transketolaze i tri glikolitička enzima: aldolaze, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze i piruvat kinaze (304). Uticaj FIN na ekspresiju ovih enzima i njihovu povezanost sa oksidacijskim stresom u mozgu nije poznat i treba da bude predmet daljih istraživanja.

Iako FIN nije imao značajan uticaj na lipidnu peroksidaciju u HE izazvanoj TAA-om u hipokampusu i *nc. caudatusu*, FIN je izazvao promene ekspresije subjedinića NADPH oksidaze i aktivnosti antioksidacijskih enzima. Pretretman FIN-om je sprečio pad ekspresije p22-phox i p67-phox subjediniće NADPH oksidaze u hipokampusu, što potencijalno može doprinositi većoj aktivnosti ovog enzima (Grafikon 4.18A i D). Nagomilavanje superoksidnog anjona u hipokampusu nakon primene FIN ublažio je porast aktivnosti citosolnog izoenzima SOD, SOD1 (Grafikoni 4.19B i 4.20B). Pretretman FIN-om je sprečio pad nivoa GSH izazvan TAA-om (Grafikon 4.21A), iako je smanjio aktivnost GR u hipokampusu u odnosu na sam TAA (Grafikon 4.22A). Primena donora sulfhidrilnih grupa bi potencijalno doprinela poboljšanju redoks stanja u hipokampusu i povećanju efikasnosti FIN u terapiji HE. Kurkumin izaziva porast aktivnosti SOD, GR i GPx u hipokampusu pacova u blagoj HE izazvanoj suženjem portne vene (263), što ga takođe čini potencijalnim kandidatom u povećanju terapijske efikasnosti FIN.

U korteksu pretretman FIN-om je sprečio pad katalaze izazvan TAA-om uz istovremeno smanjenje aktivnosti GR (Grafikon 4.22A i B). U odnosu na kontrolu nivo GSH je bio povišen u FIN+TAA₉₀₀ grupi slično kao u TAA₉₀₀ grupi (Grafikon 4.21A), najverovatnije zbog održanja aktivnosti katalaze, koja redukuje H₂O₂. Na osnovu studija sa

C-fikocijaninom (257) može se pretpostaviti da bi porast katalaze mogao biti jedan od korisnih efekata FIN na oksidacijski stres u korteksu. Ekspresija subjedinica NADPH oksidaze u HE izazvanoj TAA-om se nije značajno promenila nakon pretretmana FIN-om (Grafikon 4.18), što ukazuje da FIN najverovatnije nema značajan uticaj na stvaranje superoksidnog anjona i potentnijih radikala u korteksu.

U *nc. caudatusu* aktivnost SOD je bila povećana nakon pretretmana FIN-om, iako sam TAA nije izazvao značajnu promenu aktivnosti ovog enzima (Grafikon 4.19B). Međutim, iako FIN nije imao značajnog uticaja na aktivnost GPx i GR (Grafikoni 4.21B i 4.22A), redoks stanje *nc. caudatusa* u HE izazvanoj TAA-om, procenjeno na osnovu nivoa GSH, se pogoršava nakon primene FIN (Grafikon 4.21A). Pogoršanje redoks stanja može biti posledica povećane produkcije superoksidnog anjona pod uticajem SOD ili smanjene sinteze GSH. S obzirom na ulogu *nc. caudatusa* i putamena u motorici, ovo pogoršanje redoks stanja može biti jedan od uzroka samo delimičnog oporavka motorne aktivnosti u HE nakon primene FIN.

Neke studije su pokazale da neurosteroidi mogu biti uključeni u razvoj neuroinflamacije u HE (84). Produkcija citokina i ekspresija markera mikroglije je povišena u eksperimentalnoj akutnoj insuficijenciji jetre izazvanoj ishemijom (135) ili primenom azoksimetana (133). Takođe, nivo cirkulišućih neurosteroida je povišen u kasnoj trudnoći (305), istovremeno sa porastom incidencije HE kod gravidnih žena sa akutnom insuficijencijom jetre (306). Ovo je dovelo do razvoja teorije da periferni neurosteroidi potencijalno doprinose razvoju neuroinflamacije (84). Naši rezultati potvrđuju da je HE izazvana TAA-om praćena povećanjem ekspresije mikroglijalnog markera Iba1 u korteksu (Grafikon 4.24C). Međutim, kako FIN nije sprečio porast ekspresije ovog markera, naša studija ne podržava teoriju o ulozi neurosteroida u patogenezi neuroinflamacije u HE i sugeriše da inhibicija neuroinflamacije ne predstavlja jedan od mehanizama neuroprotektivnog dejstva FIN u HE izazvanoj TAA-om (Grafikon 4.24C).

TAA ima različite efekte na ekspresiju astrocitnog markera GFAP u pojedinim moždanim regionima. Dok se ekspresija GFAP u korteksu nije značajno menjala, TAA je indukovao ekspresiju ovog markera u hipokampusu. Pretretman FIN-om je smanjio ekspresiju GFAP, što ukazuje na moguću protektivnu ulogu FIN na astrocite u

hipokampusu u HE (Grafikon 4.24B). Iako prethodne studije uglavnom naglašavaju smanjenje ekspresije GFAP u HE izazvanoj akutnom insuficijencijom jetre (94,95), postoje indicije o regionalnim razlikama u ekspresiji astrocitnog markera. Tako je na modelu HE izazvanom portno-kavnim šantom kod pacova pokazano povećanje imunoreaktivnosti na GFAP u Bergmanovoj gliji, specijalizovanim astrocitima cerebeluma (307), a smanjenje u frontalnom korteksu (308). S druge strane, ekspresija GFAP u cirozi jetre kod ljudi se ne menja u Bergmanovoj gliji (307), što ukazuje da i tok i hronicitet HE utiču na ekspresiju GFAP. TAA i FIN nisu izazvali značajnu promenu ekspresije oligodendrocitnog markera MBP u korteksu i hipokampusu (Grafikon 4.24D), što nije iznenađujuće, s obzirom da demijelinizacija nije karakteristična morfološka promena u mozgu u HE.

Terapijska upotreba FIN bi mogla biti ograničena njegovim neželjenim efektima. Neke studije su ustanovile trajno smanjenje libida, erektilnu disfunkciju i depresiju kod pojedinih pacijenata sa hiperplazijom prostate i androgenom alopecijom, koji se mogu pripisati efektima FIN (309–311). Tumor Lajdigovih (Leydig) ćelija i akutna lokalizovana egzantematozna pustuloza takođe mogu biti posledica dugotrajne upotrebe FIN (312,313). Eksperimentalne studije su pokazale da FIN smanjuje pokretljivost i integritet membrane spermatozoida, što narušava fertilitet pacova (314).

U našoj studiji sam FIN je smanjio ekspresiju NeuN u korteksu, ali ne i u hipokampusu (Grafikon 4.24A), što ukazuje na potencijalno štetno dejstvo FIN na kortikalne neurone. Takođe, FIN je smanjio ekspresiju p22-phox i p47-phox subjedinice NADPH oksidaze (Grafikon 4.18A i C) i istovremeno povećao ekspresiju SOD1 u hipokampusu (Grafikon 4.20B) i na taj način najverovatnije održava redoks stanje hipokampalnih neurona i čak smanjuje lipidnu peroksidaciju. Povećanje ekspresije SOD1 je bar delimično odgovorno i za smanjenje lipidne peroksidacije u korteksu nakon primene FIN (Grafikon 4.20A). S druge strane sam FIN je pogoršao lipidnu peroksidaciju u *nc. caudatusu*, ali mehanizam ovog dejstva treba da bude predmet daljih istraživanja. Iako sam FIN nije izazvao bihejvioralne promene kod pacova, EEG analiza je pokazala porast srednje voltaže talasa nakon primene FIN (Grafikon 4.13), koja je bila izražena u svim frekventnim opsezima. Ovo ukazuje da FIN povećava stepen sinhronizacije neurona, ali značaj ovih promena treba da bude predmet daljih istraživanja. Osim voltaže, FIN je

uzrokovao i promene zastupljenosti EEG talasa uz smanjenje zastupljenosti delta i beta talasa (Grafikoni 4.14B i 4.17B) i povećanje zastupljenosti alfa i teta talasa (Grafikoni 4.15B i 4.16B). Odnos između korisnih i štetnih efekata FIN će odrediti mogućnost terapijske primene ovog leka u HE.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ove disertacije može se zaključiti da TAA izaziva HE kod pacova na dozno-zavistan način. TAA u dozi od 300 mg/kg izaziva blagu HE praćenu porastom voltaže beta i alfa talasa uz smanjenje zastupljenosti beta i delta i povećanje zastupljenosti alfa talasa. Ove EEG manifestacije nisu praćene bihejvioralnim promenama. Sa pogoršanjem HE smanjuje se motorna aktivnost pacova, a prvi znak pogoršanja na EEG-u je povećanje voltaže delta talasa. U dozi od 900 mg/kg TAA izaziva hepatičnu komu sa zaravnjenjem EEG-a, povećanjem zastupljenosti delta i smanjenjem zastupljenosti teta talasa i ove EEG promene predstavljaju loš prognostički znak u HE izazvanoj TAA-om. TAA u dozi od 600 mg/kg se može koristiti za ispitivanje patogenetskih mehanizama motornih promena u HE, a u dozi od 900 mg/kg za ispitivanje patogeneze terminalnih stadijuma HE, uključujući i hepatičnu komu.

TAA izaziva lipidnu peroksidaciju u mozgu na dozno-zavistan način, pri čemu je moždano stablo najosetljivije, a talamus i hipokampus najmanje osetljivi na dejstvo slobodnih radikala. Relativnoj otpornosti talamusa na lipidnu peroksidaciju izazvanu TAA-om doprinosi GPx, a hipokampusa SOD i GR. U hepatičnoj komi TAA je izazvao pad ekspresije p67-phox i porast p40-phox subjedinice NADPH oksidaze u korteksu praćene porastom aktivnosti SOD1 i GR i padom aktivnosti katalaze. U hipokampusu uočen je pad jedino katalaze, dok se aktivnost SOD, GR i GPx ne menja. Lipidna peroksidacija u *nc. caudatusu* u hepatičnoj komi izazvanoj TAA-om je praćena porastom aktivnosti GPx i smanjenjem GSH. Patogenezi hepatične kome u intoksikaciji TAA-om potencijalno doprinosi i indukcija AchE u talamusu i *nc. caudatusu*.

Pretretman finasteridom poboljšava motorne sposobnosti i EEG promene i sprečava nastanak najtežih formi HE izazvane TAA-om kod pacova, uključujući hepatičnu komu. Ovo poboljšanje toka HE se na EEG-u ogleda kroz povećanje voltaže talasa uz smanjenje zastupljenosti delta i povećanje zastupljenosti beta, alfa i teta talasa. Jedan od potencijalnih mehanizama povoljnog dejstva finasterida na tok HE izazvane TAA-om je inhibicija AchE u talamusu i *nc. caudatusu* i modulacija holinergičke transmisije. Iako finasterid menja aktivnost antioksidacijskih enzima, smanjenje oksidacijskog stresa najverovatnije ne doprinosi značajno neuroprotektivnim efektima finasterida u HE, s obzirom da primena finasterida ublažava lipidnu peroksidaciju samo u korteksu. Međutim, finasterid sprečava

pad ekspresije p22 i p67 subjedinice NADPH oksidaze u hipokampusu izazvan TAA-om, izaziva porast aktivnosti SOD1 i pad GR, dok u korteksu povećava nivo GSH i sprečava pad aktivnosti katalaze. Redoks stanje *nc. caudatusa* u HE izazvanoj TAA-om se pogoršava nakon primene finasterida, iako finasterid povećava aktivnost SOD u ovom regionu, što se može bar delimično objasniti smanjenjem aktivnosti GPx. U talamusu pretretman finasteridom sprečava porast aktivnosti GPx izazvan TAA-om, smanjuje aktivnost GR i katalaze, što pogoršava lipidnu peroksidaciju. Finasterid sprečava smanjenje ekspresije markera neurona u korteksu i povećanje markera astrocita u hipokampusu nakon tretmana TAA-om.

Bihevioralne i EEG promene ukazuju da se finasterid može koristiti kao potencijalno neuroprotektivno sredstvo u terapiji HE, ali njegova klinička upotreba zahteva prethodna istraživanja o štetnim efektima ove terapije.

7.LITERATURA

1. Bernuau J, Rueff B, Benhamou JP. Fulminant and subfulminant liver failure: definitions and causes. *Semin Liver Dis* 1986;6:97–106.
2. Gammal SH, Jones EA. Hepatic encephalopathy. *Med Clin North Am* 1989;73:793–813.
3. Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 2002;35:716–21.
4. Bajaj JS. Review article: the modern management of hepatic encephalopathy. *Alimen Pharmacol Ther* 2010;31:537–47.
5. Weissenborn K, Tietge UFJ, Bokemeyer M, Mohammadi B, Bode U, Manns MP, et al. Liver transplantation improves hepatic myelopathy: evidence by three cases. *Gastroenterology* 2003;124:346–51.
6. Frederick RT. Current Concepts in the Pathophysiology and Management of Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterol Hepatol* 2011;7:222–33.
7. Córdoba J. New assessment of hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2011;54:1030–40.
8. McCrea M, Cordoba J, Vessey G, Blei AT, Randolph C. Neuropsychological characterization and detection of subclinical hepatic encephalopathy. *Arch Neurol* 1996;53:758–63.
9. Hassanein TI, Hilsabeck RC, Perry W. Introduction to the Hepatic Encephalopathy Scoring Algorithm (HESA). *Dig Dis Sci* 2008;53:529–38.
10. Weissenborn K, Ennen JC, Schomerus H, Rückert N, Hecker H. Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2001;34:768–73.
11. Sotil EU, Gottstein J, Ayala E, Randolph C, Blei AT. Impact of preoperative overt hepatic encephalopathy on neurocognitive function after liver transplantation. *Liver Transplant* 2009;15:184–92.
12. Kircheis G, Wettstein M, Timmermann L, Schnitzler A, Häussinger D. Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2002;35:357–66.

13. Garavan H, Ross TJ, Stein EA. Right hemispheric dominance of inhibitory control: an event-related functional MRI study. *Proc Nat Acad Sci USA* 1999;96:8301–6.
14. Bajaj JS, Saeian K, Verber MD, Hirschke D, Hoffmann RG, Franco J, et al. Inhibitory control test is a simple method to diagnose minimal hepatic encephalopathy and predict development of overt hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol* 2007;102:754–60.
15. Guerit J-M, Amantini A, Fischer C, Kaplan PW, Mecarelli O, Schnitzler A, et al. Neurophysiological investigations of hepatic encephalopathy: ISHEN practice guidelines. *Liver Inter* 2009;29:789–96.
16. Amodio P, Del Piccolo F, Marchetti P, Angeli P, Iemmolo R, Caregaro L, et al. Clinical features and survival of cirrhotic patients with subclinical cognitive alterations detected by the number connection test and computerized psychometric tests. *Hepatology* 1999;29:1662–7.
17. Amodio P, Marchetti P, Del Piccolo F, De Tourtchaninoff M, Varghese P, Zuliani C, et al. Spectral versus visual EEG analysis in mild hepatic encephalopathy. *Clin Neurophysiol* 1999;110:1334–44.
18. Van der Rijt CC, Schalm SW, De Groot GH, De Vlieger M. Objective measurement of hepatic encephalopathy by means of automated EEG analysis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1984;57:423–6.
19. Mehndiratta MM, Sood GK, Sarin SK, Gupta M. Comparative evaluation of visual, somatosensory, and auditory evoked potentials in the detection of subclinical hepatic encephalopathy in patients with nonalcoholic cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1990;85:799–803.
20. Utku U, Asil T, Balci K, Uzunca I, Celik Y. Hepatic myelopathy with spastic paraparesis. *Clin Neurol Neurosurg* 2005;107:514–6.
21. Amodio P, Pellegrini a, Ubiali E, Mathy I, Piccolo F Del, Orsato R, et al. The EEG assessment of low-grade hepatic encephalopathy: comparison of an artificial neural network-expert system (ANNES) based evaluation with visual EEG readings and EEG spectral analysis. *Clin Neurophysiol* 2006;117:2243–51.

22. Bajaj JS, Hafeezullah M, Zadvornova Y, Martin E, Schubert CM, Gibson DP, et al. The effect of fatigue on driving skills in patients with hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol* 2009;10:898–905.
23. Amodio P, Del Piccolo F, Pettenò E, Mapelli D, Angeli P, Iemmolo R, et al. Prevalence and prognostic value of quantified electroencephalogram (EEG) alterations in cirrhotic patients. *J Hepatol* 2001;35:37–45.
24. Montagnese S, Amodio P, Morgan MY. Methods for diagnosing hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a multidimensional approach. *Metab Brain Dis* 2004;19:281–312.
25. Butterworth RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. *Metab Brain Dis* 2002;17:221–7.
26. Shawcross D, Jalan R. The pathophysiologic basis of hepatic encephalopathy: central role for ammonia and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2295–304.
27. Pasantes-Morales H, Franco R, Ordaz B, Ochoa LD. Mechanisms counteracting swelling in brain cells during hyponatremia. *Arch Med Res* 2002;33:237–44.
28. Chaudhry FA, Reimer RJ, Krizaj D, Barber D, Storm-Mathisen J, Copenhagen DR, et al. Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell* 1999;99:769–80.
29. Albrecht J, Norenberg MD. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 2006;44:788–94.
30. Albrecht J, Zielińska M, Norenberg MD. Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. *Biochem Pharmacol* 2010;80:1303–8.
31. Rama Rao K V, Norenberg MD. Aquaporin-4 in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2007;22:265–75.
32. Rama Rao K V, Jayakumar AR, Norenberg MD. Glutamine in the pathogenesis of acute hepatic encephalopathy. *Neurochem Inter* 2012;61:575–80.
33. Panickar KS, Jayakumar AR, Rao KVR, Norenberg MD. Ammonia-induced activation of p53 in cultured astrocytes: role in cell swelling and glutamate uptake. *Neurochem Inter* 2009;55:98–105.

34. Jayakumar AR, Tong XY, Ospel J, Norenberg MD. Role of cerebral endothelial cells in the astrocyte swelling and brain edema associated with acute hepatic encephalopathy. *Neurosci* 2012;218:305–16.
35. Nguyen JH, Yamamoto S, Steers J, Sevlever D, Lin W, Shimojima N, et al. Matrix metalloproteinase-9 contributes to brain extravasation and edema in fulminant hepatic failure mice. *J Hepatol* 2006;44:1105–14.
36. Chen F, Ohashi N, Li W, Eckman C, Nguyen JH. Disruptions of occludin and claudin-5 in brain endothelial cells in vitro and in brains of mice with acute liver failure. *Hepatology* 2009;50:1914–23.
37. Chen F, Hori T, Ohashi N, Baine A-M, Eckman CB, Nguyen JH. Occludin is regulated by epidermal growth factor receptor activation in brain endothelial cells and brains of mice with acute liver failure. *Hepatology* 2011;53:1294–305.
38. Cauli O, Rodrigo R, Llansola M, Montoliu C, Monfort P, Piedrafita B, et al. Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2009;24:69–80.
39. Bélanger M, Desjardins P, Chatauret N, Butterworth RF. Selectively increased expression of the astrocytic/endothelial glucose transporter protein GLUT1 in acute liver failure. *Glia* 2006;53:557–62.
40. Butterworth RF. Altered glial-neuronal crosstalk: cornerstone in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem Inter* 2010;57:383–8.
41. Norenberg MD. The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol* 1987;6:13–33.
42. Jalan R, Shawcross D, Davies N. The molecular pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Inter J Biochem Cell Biol* 2003;35:1175–81.
43. Häussinger D, Görg B. Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010;13:87–92.
44. Rama Rao K V, Norenberg MD. Brain energy metabolism and mitochondrial dysfunction in acute and chronic hepatic encephalopathy. *Neurochem Inter* 2012;60:697–706.

45. Srivastava A, Yadav SK, Yachha SK, Thomas MA, Saraswat VA, Gupta RK. Pro-inflammatory cytokines are raised in extrahepatic portal venous obstruction, with minimal hepatic encephalopathy. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:979–86.
46. Rama Rao K V, Jayakumar AR, Norenberg DM. Ammonia neurotoxicity: role of the mitochondrial permeability transition. *Metab Brain Dis* 2003;18:113–27.
47. Hindfelt B, Plum F, Duffy TE. Effect of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portacaval shunts. *J Clin Invest* 1977;59:386–96.
48. Lai JC, Cooper AJ. Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *J Neurochem* 1986;47:1376–86.
49. Lockwood AH, Weissenborn K, Butterworth RF. An image of the brain in patients with liver disease. *Curr Opin Neurol* 1997;10:525–33.
50. Lockwood AH, Yap EW, Wong WH. Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991;11:337–41.
51. Weissenborn K, Bokemeyer M, Ahl B, Fischer-Wasels D, Giewekemeyer K, Van den Hoff J, et al. Functional imaging of the brain in patients with liver cirrhosis. *Metab Brain Dis* 2004;19:269–80.
52. Hertz L, Kala G. Energy metabolism in brain cells: effects of elevated ammonia concentrations. *Metab Brain Dis* 2007;22:199–218.
53. Yao H, Sadoshima S, Fujii K, Kusuda K, Ishitsuka T, Tamaki K, et al. Cerebrospinal fluid lactate in patients with hepatic encephalopathy. *Eur Neurol* 1987;27:182–7.
54. Rao K V, Mawal YR, Qureshi IA. Progressive decrease of cerebral cytochrome C oxidase activity in sparse-fur mice: role of acetyl-L-carnitine in restoring the ammonia-induced cerebral energy depletion. *Neurosci Lett* 1997;224:83–6.
55. Cauli O, Mansouri MT, Agusti A, Felipo V. Hyperammonemia increases GABAergic tone in the cerebellum but decreases it in the rat cortex. *Gastroenterology* 2009;136:1359–67.
56. González-Usano A, Cauli O, Agustí A, Felipo V. Hyperammonemia alters the modulation by different neurosteroids of the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP

- pathway through NMDA- GABAA - or sigma receptors in cerebellum in vivo. *J Neurochem* 2013;125:133–43.
57. Llansola M, Montoliu C, Cauli O, Hernández-Rabaza V, Agustí A, Cabrera-Pastor A, et al. Chronic hyperammonemia, glutamatergic neurotransmission and neurological alterations. *Metab Brain Dis* 2012;28:151–4.
 58. Llansola M, Hernandez-Viadel M, Erceg S, Montoliu C, Felipo V. Increasing the function of the glutamate-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway increases the ability to learn a Y-maze task. *J Neurosci Res* 2009;87:2351–5.
 59. Monfort P, Muñoz M-D, Kosenko E, Llansola M, Sánchez-Pérez A, Cauli O, et al. Sequential activation of soluble guanylate cyclase, protein kinase G and cGMP-degrading phosphodiesterase is necessary for proper induction of long-term potentiation in CA1 of hippocampus. Alterations in hyperammonemia. *Neurochem Inter* 2004;45:895–901.
 60. Michalak A, Rose C, Butterworth J, Butterworth RF. Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure. *Hepatology* 1996;24:908–13.
 61. Hermenegildo C, Monfort P, Felipo V. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis. *Hepatology* 2000;31:709–15.
 62. Yao H, Haddad GG. Calcium and pH homeostasis in neurons during hypoxia and ischemia. *Cell Calcium* 2004;36:247–55.
 63. Rodriguez-Rodriguez P, Almeida A, Bolaños JP. Brain energy metabolism in glutamate-receptor activation and excitotoxicity: role for APC/C-Cdh1 in the balance glycolysis/pentose phosphate pathway. *Neurochem Inter* 2013;62:750–6.
 64. Kosenko E, Kaminsky Y, Stavroskaya IG, Felipo V. Alteration of mitochondrial calcium homeostasis by ammonia-induced activation of NMDA receptors in rat brain in vivo. *Brain Res* 2000;880:139–46.
 65. Kosenko E, Kaminsky Y, Grau E, Miñana MD, Marcaida G, Grisolia S, et al. Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by

- activation of the NMDA receptor and Na⁺,K⁺-ATPase. *J Neurochem* 1994;63:2172–8.
66. Rose C. Effect of ammonia on astrocytic glutamate uptake/release mechanisms. *J Neurochem* 2006;97 Suppl 1:11–5.
 67. Norenberg MD, Huo Z, Neary JT, Roig-Cantesano A. The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia* 1997;21:124–33.
 68. Butterworth RF. Glutamate transporters in hyperammonemia. *Neurochem Inter* 2002;41:81–5.
 69. Chan H, Hazell AS, Desjardins P, Butterworth RF. Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurochem Inter* 2000;37:243–8.
 70. Swain MS, Bergeron M, Audet R, Blei AT, Butterworth RF. Monitoring of neurotransmitter amino acids by means of an indwelling cisterna magna catheter: a comparison of two rodent models of fulminant liver failure. *Hepatology* 1992;16:1028–35.
 71. Bruno V, Battaglia G, Copani A, D’Onofrio M, Di Iorio P, De Blasi A, et al. Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:1013–33.
 72. Alagarsamy S, Marino MJ, Rouse ST, Gereau RW, Heinemann SF, Conn PJ. Activation of NMDA receptors reverses desensitization of mGluR5 in native and recombinant systems. *Nature Neurosci* 1999;2:234–40.
 73. ElMlili N, Boix J, Ahabrach H, Rodrigo R, Errami M, Felipo V. Chronic hyperammonemia induces tonic activation of NMDA receptors in cerebellum. *J Neurochem* 2010;112:1005–14.
 74. Corbalán R, Hernández-Viadel M, Llansola M, Montoliu C, Felipo V. Chronic hyperammonemia alters protein phosphorylation and glutamate receptor-associated signal transduction in brain. *Neurochem Inter* 2002;41:103–8.
 75. Hermenegildo C, Montoliu C, Llansola M, Muñoz MD, Gaztelu JM, Miñana MD, et al. Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP

- pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo. *Eur J Neurosci* 1998;10:3201–9.
76. Chepkova AN, Selbach O, Haas HL, Sergeeva OA. Ammonia-induced deficit in corticostriatal long-term depression and its amelioration by zaprinast. *J Neurochem* 2012;122:545–56.
 77. Cauli O, Mlili N, Llansola M, Felipo V. Motor activity is modulated via different neuronal circuits in rats with chronic liver failure than in normal rats. *Eur J Neurosci* 2007;25:2112–22.
 78. Cauli O, Llansola M, Erceg S, Felipo V. Hypolocomotion in rats with chronic liver failure is due to increased glutamate and activation of metabotropic glutamate receptors in substantia nigra. *J Hepatol* 2006;45:654–61.
 79. Ahboucha S, Butterworth RF. The neurosteroid system: implication in the pathophysiology of hepatic encephalopathy. *Neurochem Inter* 2008;52:575–87.
 80. Paul SM, Purdy RH. Neuroactive steroids. *FASEB J* 1992;6:2311–22.
 81. Lambert JJ, Belelli D, Peden DR, Vardy AW, Peters JA. Neurosteroid modulation of GABAA receptors. *Prog Neurobiol* 2003;71:67–80.
 82. Baulieu EE. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* 1998;23:963–87.
 83. Do Rego JL, Seong JY, Burel D, Leprince J, Luu-The V, Tsutsui K, et al. Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Front Neuroendocrinol* 2009;30:259–301.
 84. Ahboucha S, Gamrani H, Baker G. GABAergic neurosteroids: the “endogenous benzodiazepines” of acute liver failure. *Neurochem Inter* 2012;60:707–14.
 85. Hu J, Zhang Z, Shen W-J, Azhar S. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab* 2010;7:47.
 86. Norenberg MD, Itzhak Y, Bender AS. The peripheral benzodiazepine receptor and neurosteroids in hepatic encephalopathy. *Adv Exp Med Biol* 1997;420:95–111.

87. Hazell AS, Normandin L, Nguyen B, Kennedy G. Upregulation of “peripheral-type” benzodiazepine receptors in the globus pallidus in a sub-acute rat model of manganese neurotoxicity. *Neurosci Lett* 2003;349:13–6.
88. Bourdiol F, Toulmond S, Serrano A, Benavides J, Scatton B. Increase in omega 3 (peripheral type benzodiazepine) binding sites in the rat cortex and striatum after local injection of interleukin-1, tumour necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *Brain Res* 1991;543:194–200.
89. Belelli D, Lambert JJ. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nature Rev Neurosci* 2005;6:565–75.
90. Ahboucha S, Talani G, Fanutza T, Sanna E, Biggio G, Gamrani H, et al. Reduced brain levels of DHEAS in hepatic coma patients: significance for increased GABAergic tone in hepatic encephalopathy. *Neurochem Inter* 2012;61:48–53.
91. Müller-Preuss P, Rupprecht R, Lancel M. The effects of the neuroactive steroid 3 alpha,5 alpha-THDOC on sleep in the rat. *Neuroreport* 2002;13:487–90.
92. Ladurelle N, Eychenne B, Denton D, Blair-West J, Schumacher M, Robel P, et al. Prolonged intracerebroventricular infusion of neurosteroids affects cognitive performances in the mouse. *Brain Res* 2000;858:371–9.
93. Desjardins P, Bélanger M, Butterworth RF. Alterations in expression of genes coding for key astrocytic proteins in acute liver failure. *J Neurosci Res* 2001;66:967–71.
94. Butterworth RF. Alterations of neurotransmitter-related gene expression in human and experimental portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 1998;13:337–49.
95. Melcangi RC, Magnaghi V, Cavarretta I, Riva MA, Martini L. Corticosteroid effects on gene expression of myelin basic protein in oligodendrocytes and of glial fibrillary acidic protein in type 1 astrocytes. *J Neuroendocrinol* 1997;9:729–33.
96. Guo Q, Sayeed I, Baronne LM, Hoffman SW, Guennoun R, Stein DG. Progesterone administration modulates AQP4 expression and edema after traumatic brain injury in male rats. *Exp Neurol* 2006;198:469–78.

97. Guerin C, Wolff JE, Laterra J, Drewes LR, Brem H, Goldstein GW. Vascular differentiation and glucose transporter expression in rat gliomas: effects of steroids. *Ann Neurol* 1992;31:481–7.
98. Manoli I, Le H, Alesci S, McFann KK, Su YA, Kino T, et al. Monoamine oxidase-A is a major target gene for glucocorticoids in human skeletal muscle cells. *FASEB J* 2005;19:1359–61.
99. Lamba V, Yasuda K, Lamba JK, Assem M, Davila J, Strom S, et al. PXR (NR1I2): splice variants in human tissues, including brain, and identification of neurosteroids and nicotine as PXR activators. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;199:251–65.
100. Bender AS, Norenberg MD. Effect of benzodiazepines and neurosteroids on ammonia-induced swelling in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* 1998;54:673–80.
101. Ahboucha S. Neurosteroids and hepatic encephalopathy: an update on possible pathophysiologic mechanisms. *Curr Mol Pharmacol* 2011;4:1–13.
102. Casellas P, Galiegue S, Basile AS. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Inter* 2002;40:475–86.
103. Alho H, Harjuntausta T, Schultz R, Pelto-Huikko M, Bovolin P. Immunohistochemistry of diazepam binding inhibitor (DBI) in the central nervous system and peripheral organs: its possible role as an endogenous regulator of different types of benzodiazepine receptors. *Neuropharmacology* 1991;30:1381–6.
104. Rothstein JD, McKhann G, Guarneri P, Barbaccia ML, Guidotti A, Costa E. Cerebrospinal fluid content of diazepam binding inhibitor in chronic hepatic encephalopathy. *Ann Neurol* 1989;26:57–62.
105. Dodd PR, Thomas GJ, Harper CG, Kril JJ. Amino acid neurotransmitter receptor changes in cerebral cortex in alcoholism: effect of cirrhosis of the liver. *J Neurochem* 1992;59:1506–15.
106. Mans AM, Kukulka KM, McAvoy KJ, Rokosz NC. Regional distribution and kinetics of three sites on the GABAA receptor: lack of effect of portacaval shunting. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992;12:334–46.
107. Ahboucha S, Desjardins P, Chatauret N, Pomier-Layrargues G, Butterworth RF. Normal coupling of brain benzodiazepine and neurosteroid modulatory sites on the

- GABA-A receptor complex in human hepatic encephalopathy. *Neurochem Inter* 2003;43:551–6.
108. Song G, Dhodda VK, Blei AT, Dempsey RJ, Rao VLR. GeneChip analysis shows altered mRNA expression of transcripts of neurotransmitter and signal transduction pathways in the cerebral cortex of portacaval shunted rats. *J Neurosci Res* 2002;68:730–7.
 109. Butterworth RF, Lavoie J, Giguère JF, Pomier-Layrargues G. Affinities and densities of high-affinity [3H]muscimol (GABA-A) binding sites and of central benzodiazepine receptors are unchanged in autopsied brain tissue from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Hepatology* 1988;8:1084–8.
 110. Palomero-Gallagher N, Bidmon H-J, Cremer M, Schleicher A, Kircheis G, Reifenberger G, et al. Neurotransmitter receptor imbalances in motor cortex and basal ganglia in hepatic encephalopathy. *Cell Physiol Biochem* 2009;24:291–306.
 111. Hadesman R, Wiesner RH, Go VL, Tyce GM. Concentrations of 3,4-dihydroxyphenylalanine and catecholamines and metabolites in brain in an hepatic model of hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 1995;65:1166–75.
 112. Michalak A, Rose C, Buu PN, Butterworth RF. Evidence for altered central noradrenergic function in experimental acute liver failure in the rat. *Hepatology* 1998;27:362–8.
 113. McCandless DW, Looney GA, Modak AT, Stavinoha WB. Cerebral acetylcholine and energy metabolism changes in acute ammonia intoxication in the lower primate *Tupaia glis*. *J Lab Clin Med* 1985;106:183–6.
 114. García-Ayllón M-S, Cauli O, Silveyra M-X, Rodrigo R, Candela A, Compañ A, et al. Brain cholinergic impairment in liver failure. *Brain* 2008;131(Pt 11):2946–56.
 115. Piche T, Vanbiervliet G, Cherikh F, Antoun Z, Huet PM, Gelsi E, et al. Effect of ondansetron, a 5-HT₃ receptor antagonist, on fatigue in chronic hepatitis C: a randomised, double blind, placebo controlled study. *Gut* 2005;54:1169–73.
 116. Reddy PVB, Murthy CRK, Reddanna P. Fulminant hepatic failure induced oxidative stress in nonsynaptic mitochondria of cerebral cortex in rats. *Neurosci Lett* 2004;368:15–20.

117. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992;59:1609–23.
118. Häussinger D, Görg B, Reinehr R, Schliess F. Protein tyrosine nitration in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2005;20:285–94.
119. Görg B, Schliess F, Häussinger D. Osmotic and oxidative/nitrosative stress in ammonia toxicity and hepatic encephalopathy. *Arch Biochem Biophys* 2013; doi: 10.1016/j.abb.2013.03.010.(in press)
120. Jayakumar AR, Bethea JR, Tong XY, Gomez J, Norenberg MD. NF- κ B in the mechanism of brain edema in acute liver failure: studies in transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2011;41:498–507.
121. Beatrice MC, Palmer JW, Pfeiffer DR. The relationship between mitochondrial membrane permeability, membrane potential, and the retention of Ca²⁺ by mitochondria. *J Biol Chem* 1980;255:8663–71.
122. Bernardi P. The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim Biophys Acta* 1996;1275:5–9.
123. Crompton M, Virji S, Ward JM. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem / FEBS* 1998;258:729–35.
124. Gunter TE, Pfeiffer DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 1990;258:C755–86.
125. Bernardi P, Colonna R, Costantini P, Eriksson O, Fontaine E, Ichas F, et al. The mitochondrial permeability transition. *BioFactors* 1998;8:273–81.
126. Bustamante J, Lores-Arnaiz S, Tallis S, Roselló DM, Lago N, Lemberg A, et al. Mitochondrial dysfunction as a mediator of hippocampal apoptosis in a model of hepatic encephalopathy. *Mol Cell Biochem* 2011;354:231–40.
127. Bai G, Rama Rao K V, Murthy CR, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD. Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* 2001;66:981–91.

128. Alvarez VM, Rama Rao K V, Brahmabhatt M, Norenberg MD. Interaction between cytokines and ammonia in the mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* 2011;89:2028–40.
129. Jayakumar AR, Panickar KS, Norenberg MD. Effects on free radical generation by ligands of the peripheral benzodiazepine receptor in cultured neural cells. *J Neurochem* 2002;83:1226–34.
130. Butterworth RF. Hepatic encephalopathy: a central neuroinflammatory disorder? *Hepatology* 2011;53:1372–6.
131. Shawcross DL, Shabbir SS, Taylor NJ, Hughes RD. Ammonia and the neutrophil in the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 2010;51:1062–9.
132. Van Rossum D, Hanisch U-K. Microglia. *Metab Brain Dis* 2004;19:393–411.
133. Bémeur C, Qu H, Desjardins P, Butterworth RF. IL-1 or TNF receptor gene deletion delays onset of encephalopathy and attenuates brain edema in experimental acute liver failure. *Neurochem Inter* 2010;56:213–5.
134. D’Mello C, Le T, Swain MG. Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor- α signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci* 2009;29:2089–102.
135. Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Direct evidence for central proinflammatory mechanisms in rats with experimental acute liver failure: protective effect of hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29:944–52.
136. Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Garcia-Verdugo J-M, et al. Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 2010;139:675–84.
137. Licinio J, Wong ML. Pathways and mechanisms for cytokine signaling of the central nervous system. *J Clin Invest* 1997;100:2941–7.
138. James JH, Escourrou J, Fischer JE. Blood-brain neutral amino acid transport activity is increased after portacaval anastomosis. *Science* 1978;200:1395–7.

139. Smith AR, Rossi-Fanelli F, Ziparo V, James JH, Perelle BA, Fischer JE. Alterations in plasma and CSF amino acids, amines and metabolites in hepatic coma. *Ann Surg* 1978;187:343–50.
140. Skowrońska M, Albrecht J. Alterations of blood brain barrier function in hyperammonemia: an overview. *Neurotox Res* 2012;21:236–44.
141. Jessy J, Mans AM, DeJoseph MR, Hawkins RA. Hyperammonaemia causes many of the changes found after portacaval shunting. *Biochem J* 1990;272:311–7.
142. Hilgier W, Zitting A, Albrecht J. The brain octopamine and phenylethanolamine content in rats in thioacetamide-induced hepatogenic encephalopathy. *Acta Neurol Scand* 1985;71:195–8.
143. Cangiano C, Cardelli-Cangiano P, James JH, Rossi-Fanelli F, Patrizi MA, Brackett KA, et al. Brain microvessels take up large neutral amino acids in exchange for glutamine. Cooperative role of Na⁺-dependent and Na⁺-independent systems. *J Biol Chem* 1983;258:8949–54.
144. Gow AG, Marques AI, Yool DA, Crawford K, Warman SM, Eckersall PD, et al. Dogs with congenital porto-systemic shunting (cPSS) and hepatic encephalopathy have higher serum concentrations of C-reactive protein than asymptomatic dogs with cPSS. *Metab Brain Dis* 2012;27:227–9.
145. Hung K-C, Yong C-C, Chen Y-S, Eng H-L, Kuo F-Y, Lin C-C, et al. A surgical model of fulminant hepatic failure in rabbits. *Liver Inter* 2007;27:1333–41.
146. Frühauf NR, Radunz S, Grabellus F, Laube T, Uerschels AK, Kaiser GM. Neuromonitoring in a porcine model of acute hepatic failure. *Lab Anim* 2011;45:174–8.
147. Baine A-MT, Hori T, Chen F, Gardner LB, Uemoto S, Nguyen JH. Fulminant liver failure models with subsequent encephalopathy in the mouse. *Hepatobil Pancr Dis Inter* 2011;10:611–9.
148. Staziaki P V, Marques CM, Delattre AM, De Paula Cioni B, Rufino M, Dos Santos FV, et al. Fish oil has beneficial effects on behavior impairment and oxidative stress in rats subjected to a hepatic encephalopathy model. *CNS Neurol Dis Drug Targ* 2013;12:84–93.

149. Butterworth RF, Norenberg MD, Felipo V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Inter* 2009;29:783–8.
150. Leke R, Bak LK, Iversen P, Sørensen M, Keiding S, Vilstrup H, et al. Synthesis of neurotransmitter GABA via the neuronal tricarboxylic acid cycle is elevated in rats with liver cirrhosis consistent with a high GABAergic tone in chronic hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 2011;117:824–32.
151. Avraham Y, Grigoriadis N, Poutahidis T, Vorobiev L, Magen I, Ilan Y, et al. Cannabidiol improves brain and liver function in a fulminant hepatic failure-induced model of hepatic encephalopathy in mice. *Br J Pharmacol* 2011;162:1650–8.
152. Tuñón MJ, Alvarez M, Culebras JM G-GJ. An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World J Gastroenterol* 2009;15:3086–98.
153. Traber P, DalCanto M, Ganger D, Blei AT. Effect of body temperature on brain edema and encephalopathy in the rat after hepatic devascularization. *Gastroenterology* 1989;96:885–91.
154. Traber PG, Dal Canto M, Ganger DR, Blei AT. Electron microscopic evaluation of brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatic failure: ultrastructure and integrity of the blood-brain barrier. *Hepatology* 1987;7:1272–7.
155. Panatto JP, Jeremias IC, Ferreira GK, Ramos AC, Rochi N, Gonçalves CL, et al. Inhibition of mitochondrial respiratory chain in the brain of rats after hepatic failure induced by acetaminophen. *Mol Cell Biochem* 2011;350:149–54.
156. Bélanger M, Côté J, Butterworth RF. Neurobiological characterization of an azoxymethane mouse model of acute liver failure. *Neurochem Inter* 2006;48:434–40.
157. Mladenović D, Radosavljević T, Hrnčić D, Rašić-Marković A, Puškaš N, Maksić N, et al. Behavioral and electroencephalographic manifestations of thioacetamide-induced encephalopathy in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2012;90:1219–27.
158. Swain M, Butterworth RF, Blei AT. Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology* 1992;15:449–53.

159. Potvin M, Finlayson MH, Hinchey EJ, Lough JO, Goresky CA. Cerebral abnormalities in hepatectomized rats with acute hepatic coma. *Lab Invest* 1984;50:560–4.
160. Chatauret N, Rose C, Therrien G, Butterworth RF. Mild hypothermia prevents cerebral edema and CSF lactate accumulation in acute liver failure. *Metab Brain Dis* 2001;16:95–102.
161. Dixit V, Chang TM. Brain edema and the blood brain barrier in galactosamine-induced fulminant hepatic failure rats. An animal model for evaluation of liver support systems. *ASAIO transactions* 1990;36:21–7.
162. Horowitz ME, Schafer DF, Molnar P, Jones EA, Blasberg RG, Patlak CS, et al. Increased blood-brain transfer in a rabbit model of acute liver failure. *Gastroenterology* 1983;84:1003–11.
163. Albrecht J. Cerebral RNA synthesis in experimental hepatogenic encephalopathy. *J Neurosci Res* 1981;6:553–8.
164. Zimmermann C, Ferenci P, Pifl C, Yurdaydin C, Ebner J, Lassmann H, et al. Hepatic encephalopathy in thioacetamide-induced acute liver failure in rats: characterization of an improved model and study of amino acid-ergic neurotransmission. *Hepatology* 1989;9:594–601.
165. Dyroff MC, Neal RA. Identification of the major protein adduct formed in rat liver after thioacetamide administration. *Cancer Res* 1981;41:3430–5.
166. Maddison JE, Dodd PR, Morrison M, Johnston GA, Farrell GC. Plasma GABA, GABA-like activity and the brain GABA-benzodiazepine receptor complex in rats with chronic hepatic encephalopathy. *Hepatology* 1987;7:621–8.
167. Hawkins PA, DeJoseph MR, Hawkins RA. Eliminating metabolic abnormalities of portacaval shunting by restoring normal liver blood flow. *Am J Physiol* 1996;270:E1037–42.
168. Butterworth RF, Girard G, Giguère JF. Regional differences in the capacity for ammonia removal by brain following portocaval anastomosis. *J Neurochem* 1988;51:486–90.

169. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984;65:305–11.
170. Dunn CW, Horton JW, Megison SM, Vuitch MF. Contribution of portal systemic shunt to Kupffer cell dysfunction in obstructive jaundice. *J Surg Res* 1991;50:234–9.
171. Greve JW, Gouma DJ, Soeters PB, Buurman WA. Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: a study with germ-free rats. *Gastroenterology* 1990;98:478–85.
172. Jover R, Rodrigo R, Felipe V, Insausti R, Sáez-Valero J, García-Ayllón MS, et al. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:1257–66.
173. Llansola M, Rodrigo R, Monfort P, Montoliu C, Kosenko E, Cauli O, et al. NMDA receptors in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2007;22:321–35.
174. Haghghat N, McCandless DW, Geraminegad P. Responses in primary astrocytes and C6-glioma cells to ammonium chloride and dibutyryl cyclic-AMP. *Neurochem Res* 2000;25:277–84.
175. Ganz R, Swain M, Traber P, DalCanto M, Butterworth RF, Blei AT. Ammonia-induced swelling of rat cerebral cortical slices: implications for the pathogenesis of brain edema in acute hepatic failure. *Metab Brain Dis* 1989;4:213–23.
176. Pidoplichko VI, Dani JA. Acid-sensitive ionic channels in midbrain dopamine neurons are sensitive to ammonium, which may contribute to hyperammonemia damage. *Proc Nat Acad Sci USA* 2006;103:11376–80.
177. Rodrigo R, Erceg S, Rodriguez-Diaz J, Saez-Valero J, Piedrafita B, Suarez I, et al. Glutamate-induced activation of nitric oxide synthase is impaired in cerebral cortex in vivo in rats with chronic liver failure. *J Neurochem* 2007;102:51–64.
178. Zielińska M, Law RO, Albrecht J. Excitotoxic mechanism of cell swelling in rat cerebral cortical slices treated acutely with ammonia. *Neurochem Inter* 2003;43:299–303.

179. Azzouni F, Zeitouni N, Mohler J. Role of 5 α -reductase inhibitors in androgen-stimulated skin disorders. *J Drugs Dermatol* 2013;12:e30–5.
180. Rick FG, Saadat SH, Szalontay L, Block NL, Kazzazi A, Djavan B, et al. Hormonal manipulation of benign prostatic hyperplasia. *Curr Opin Urol* 2013;23:17–24.
181. Mukai Y, Higashi T, Nagura Y, Shimada K. Studies on neurosteroids XXV. Influence of a 5 α -reductase inhibitor, finasteride, on rat brain neurosteroid levels and metabolism. *Biol Pharm Bull* 2008;31:1646–50.
182. Usami N, Yamamoto T, Shintani S, Ishikura S, Higaki Y, Katagiri Y, et al. Substrate specificity of human 3(20) α -hydroxysteroid dehydrogenase for neurosteroids and its inhibition by benzodiazepines. *Biol Pharm Bull* 2002;25:441–5.
183. Funae Y, Kishimoto W, Cho T, Niwa T, Hiroi T. CYP2D in the brain. *Drug Metab Pharmacokin* 2003;18:337–49.
184. Ugale RR, Sharma AN, Kokare DM, Hirani K, Subhedar NK, Chopde CT. Neurosteroid allopregnanolone mediates anxiolytic effect of etifoxine in rats. *Brain Res* 2007;1184:193–201.
185. Biagini G, Panuccio G, Avoli M. Neurosteroids and epilepsy. *Curr Opin Neurol* 2010;23:170–6.
186. Duborija-Kovacevic N, Jakovljevic V, Sabo A, Tomic Z. Anti-nociceptive and anti-inflammatory properties of 5 α -reductase inhibitor finasteride in experimental animals. *Eur J Drug Metab Pharmacokin* 2008;33:181–6.
187. Ford MM, Nickel JD, Finn D a. Treatment with and withdrawal from finasteride alter ethanol intake patterns in male C57BL/6J mice: potential role of endogenous neurosteroids? *Alcohol* 2005;37:23–33.
188. Reddy DS, Kim HY, Rogawski MA. Neurosteroid withdrawal model of perimenstrual catamenial epilepsy. *Epilepsia* 2001;42:328–36.
189. Martin BS, Kapur J. A combination of ketamine and diazepam synergistically controls refractory status epilepticus induced by cholinergic stimulation. *Epilepsia* 2008;49:248–55.

190. Sun C, Mchedlishvili Z, Erisir A, Kapur J. Diminished neurosteroid sensitivity of synaptic inhibition and altered location of the alpha4 subunit of GABA(A) receptors in an animal model of epilepsy. *J Neurosci* 2007;27:12641–50.
191. Lawrence C, Martin BS, Sun C, Williamson J, Kapur J. Endogenous neurosteroid synthesis modulates seizure frequency. *Ann Neurol* 2011;67:689–93.
192. Moradi-Azani M, Ahmadiani A, Amini H. Increase in formalin-induced tonic pain by 5alpha-reductase and aromatase inhibition in female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2011;98:62–6.
193. Peng H-Y, Chen G-D, Lee S-D, Lai C-Y, Chiu C-H, Cheng C-L, et al. Neuroactive steroids inhibit spinal reflex potentiation by selectively enhancing specific spinal GABA(A) receptor subtypes. *Pain* 2009;143:12–20.
194. Patte-Mensah C, Li S, Mensah-Nyagan AG. Impact of neuropathic pain on the gene expression and activity of cytochrome P450side-chain-cleavage in sensory neural networks. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2274–84.
195. Meyer L, Venard C, Schaeffer V, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG. The biological activity of 3alpha-hydroxysteroid oxido-reductase in the spinal cord regulates thermal and mechanical pain thresholds after sciatic nerve injury. *Neurobiol Dis* 2008;30:30–41.
196. Amini H, Ahmadiani A. Increase in testosterone metabolism in the rat central nervous system by formalin-induced tonic pain. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;74:199–204.
197. Sanna E, Talani G, Busonero F, Pisu MG, Purdy RH, Serra M, et al. Brain steroidogenesis mediates ethanol modulation of GABAA receptor activity in rat hippocampus. *J Neurosci* 2004;24:6521–30.
198. Sundstrom-Poromaa I, Smith DH, Gong QH, Sabado TN, Li X, Light A, et al. Hormonally regulated alpha(4)beta(2)delta GABA(A) receptors are a target for alcohol. *Nat Neurosci* 2002;5:721–2.
199. Pierucci-Lagha A, Covault J, Feinn R, Nellissery M, Hernandez-Avila C, Oncken C, et al. GABRA2 alleles moderate the subjective effects of alcohol, which are attenuated by finasteride. *Neuropsychopharmacol* 2005;30:1193–203.

200. Romeo E, Brancati A, De Lorenzo A, Fucci P, Furnari C, Pompili E, et al. Marked decrease of plasma neuroactive steroids during alcohol withdrawal. *Clin Neuropharmacol* 1996;19:366–9.
201. Bortolato M, Frau R, Orrù M, Bourov Y, Marrosu F, Mereu G, et al. Antipsychotic-like properties of 5-alpha-reductase inhibitors. *Neuropsychopharmacol* 2008;33:3146–56.
202. Thigpen AE, Russell DW. Four-amino acid segment in steroid 5 alpha-reductase 1 confers sensitivity to finasteride, a competitive inhibitor. *J Biol Chem* 1992;267:8577–83.
203. Finn DA, Ford MM, Wiren KM, Roselli CE, Crabbe JC. The role of pregnane neurosteroids in ethanol withdrawal: behavioral genetic approaches. *Pharmacol Ther* 2004;101:91–112.
204. Norton NS, McConnell JR, Rodriguez-Sierra JF. Behavioral and physiological sex differences observed in an animal model of fulminant hepatic encephalopathy in the rat. *Physiol Behav* 1997;62:1113–24.
205. Hrncić D, Rasić-Marković A, Krstić D, Macut D, Djuric D, Stanojlović O. The role of nitric oxide in homocysteine thiolactone-induced seizures in adult rats. *Cell Mol Neurobiol* 2010;30:219–31.
206. Stanojlović O, Rasić-Marković A, Hrncić D, Susić V, Macut D, Radosavljević T, et al. Two types of seizures in homocysteine thiolactone-treated adult rats, behavioral and electroencephalographic study. *Cell Mol Neurobiol* 2009;29:329–39.
207. Aruoma OI, Halliwell B, Laughton MJ, Quinlan GJ, Gutteridge JM. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *Biochem J* 1989;258:617–20.
208. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* [Internet]. 1951;193:265–75.
209. Beutler E. *Red Cell Metabolism, A Manual of Biochemical Methods*. 3rd Ed. New York: Grune and Startton; 1984.

210. Whittaker VP. The subcellular fractionation of brain tissue with special reference to the preparation of synaptosomes and their component organelles. *Methods Neuroch* 1972;2:1–52.
211. Rehncrona S, Smith DS, Akesson B, Westerberg E, Siesjö BK. Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺- and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *J Neurochem* 1980;34:1630–8.
212. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70–7.
213. Günzler WA, Kremers H, Flohé L. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9-) in blood. *Zeitsch Klin Chem Klin Biochem* 1974;12:444–8.
214. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985;113:484–90.
215. Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem* 1978;90:81–9.
216. Góth L. Serum catalase: reversibly formed charge isoform of erythrocyte catalase. *Clin Chem* 1991;37:2043–7.
217. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88–95.
218. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
219. De Lima JM, De Freitas FJC, Amorim RNL, Câmara ACL, Batista JS, Soto-Blanco B. Clinical and pathological effects of *Calotropis procera* exposure in sheep and rats. *Toxicol* 2011;57:183–5.
220. Parsons-Smith BG, Summerskill WH, Dawson AM, Sherlock S. The electroencephalograph in liver disease. *Lancet* 1957;273:867–71.
221. Wu J-Y, Yue J, Feng Y-Q. Determination of brain cytochrome P450 2E1 activity in rat with the probe of chlorzoxazone by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr. B, Anal Tech Biomed Life Sci* 2011;879:260–6.

222. Peeling J, Shoemaker L, Gauthier T, Benarroch A, Sutherland GR, Minuk GY. Cerebral metabolic and histological effects of thioacetamide-induced liver failure. *Am J Physiol* 1993;265:G572–8.
223. Méndez M, Méndez-López M, Lopez L, Aller MA, Arias J, Arias JL. Mammillary body alterations and spatial memory impairment in Wistar rats with thioacetamide-induced cirrhosis. *Brain Res* 2008;1233:185–95.
224. Hermenegildo C, Marcaida G, Montoliu C, Grisolia S, Miñana MD, Felipe V. NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. *Neurochem Res* 1996;21:1237–44.
225. Montagnese S, Jackson C, Morgan MY. Spatio-temporal decomposition of the electroencephalogram in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2007;46:447–58.
226. Sagalés T, Gimeno V, De la Calzada MD, Casellas F, Dolors Macià M, Villar Soriano M. Brain mapping analysis in patients with hepatic encephalopathy. *Brain Topogr* 1990;2:221–8.
227. Kullmann F, Hollerbach S, Lock G, Holstege A, Dierks T, Schölmerich J. Brain electrical activity mapping of EEG for the diagnosis of (sub)clinical hepatic encephalopathy in chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:513–22.
228. Albrecht J, Jones EA. Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci* 1999;170:138–46.
229. Méndez M, Méndez-López M, López L, Aller MA, Arias J, Cimadevilla JM, et al. Spatial memory alterations in three models of hepatic encephalopathy. *Behav Brain Res* 2008;188:32–40.
230. Amodio P, Gatta A. Neurophysiological investigation of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2005;20:369–79.
231. Hunter GRW, Young GB. Recovery of awareness after hyperacute hepatic encephalopathy with “flat” EEG, severe brain edema and deep coma. *Neurocrit Care* 2010;13:247–51.

232. Chamuleau RA, Deutz NE, De Haan JG, Van Gool J. Correlation between electroencephalographic and biochemical indices in acute hepatic encephalopathy in rats. *J Hepatol* 1987;4:299–306.
233. Hunter AL, Holscher MA, Neal RA. Thioacetamide-induced hepatic necrosis. I. Involvement of the mixed-function oxidase enzyme system. *J Pharmacol Exp Ther* 1977;200:439–48.
234. Porter WR, Gudzinowicz MJ, Neal RA. Thioacetamide-induced hepatic necrosis. II. Pharmacokinetics of thioacetamide and thioacetamide-S-oxide in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1979;208:386–91.
235. Miranda AS de, Rodrigues DH, Vieira LB, Lima CX, Rachid MA, Vidigal PVT, et al. A thioacetamide-induced hepatic encephalopathy model in C57BL/6 mice: a behavioral and neurochemical study. *Arq neuropsiquiatr* 2010;68:597–602.
236. Avraham Y, Israeli E, Gabbay E, Okun A, Zolotarev O, Silberman I, et al. Endocannabinoids affect neurological and cognitive function in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in mice. *Neurobiol Dis* 2006;21:237–45.
237. Zarros A, Theocharis S, Skandali N, Tsakiris S. Effects of fulminant hepatic encephalopathy on the adult rat brain antioxidant status and the activities of acetylcholinesterase, (Na(+),K (+))- and Mg (2+)-ATPase: comparison of the enzymes' response to in vitro treatment with ammonia. *Metab Brain Dis* 2008;23:255–64.
238. Túnez I, Muñoz MC, Medina FJ, Salcedo M, Feijóo M, Montilla P. Comparison of melatonin, vitamin E and L-carnitine in the treatment of neuro- and hepatotoxicity induced by thioacetamide. *Cell Biochem Func* 2007;25:119–27.
239. Chadipiralla K, Reddanna P, Chinta RM, Reddy PVB. Thioacetamide-induced fulminant hepatic failure induces cerebral mitochondrial dysfunction by altering the electron transport chain complexes. *Neurochem Res* 2012;37:59–68.
240. Sathyasaikumar K V, Swapna I, Reddy PVB, Murthy CRK, Dutta Gupta A, Senthilkumaran B, et al. Fulminant hepatic failure in rats induces oxidative stress differentially in cerebral cortex, cerebellum and pons medulla. *Neurochem Res* 2007;32:517–24.

241. Wang X, Zaidi A, Pal R, Garrett AS, Braceras R, Chen X, et al. Genomic and biochemical approaches in the discovery of mechanisms for selective neuronal vulnerability to oxidative stress. *BMC Neurosci* 2009;10:12.
242. Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 1984;225:1168–70.
243. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 1991;30:572–80.
244. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003;39:889–909.
245. Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *New Engl J Med* 2001;344:1688–700.
246. Balasubramanian V, Wright G, Sharma V, Davies NA, Sharifi Y, Habtesion A, et al. Ammonia reduction with ornithine phenylacetate restores brain eNOS activity via the DDAH-ADMA pathway in bile duct-ligated cirrhotic rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;302:G145–52.
247. Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007;87:245–313.
248. Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, Rittinger K. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* 2003;113:343–55.
249. Han CH, Freeman JL, Lee T, Motalebi SA, Lambeth JD. Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem* 1998;273:16663–8.
250. Reinehr R, Görg B, Becker S, Qvartskhava N, Bidmon HJ, Selbach O, et al. Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. *Glia* 2007;55:758–71.
251. Norenberg MD, Rama Rao K V, Jayakumar AR. Signaling factors in the mechanism of ammonia neurotoxicity. *Metab Brain Dis* 2009;24:103–17.

252. Bánfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause K-H. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem* 2004;279:46065–72.
253. Kiss PJ, Knisz J, Zhang Y, Baltrusaitis J, Sigmund CD, Thalmann R, et al. Inactivation of NADPH oxidase organizer 1 results in severe imbalance. *Curr Biol* 2006;16:208–13.
254. Martyn KD, Frederick LM, Von Loehneysen K, Dinauer MC, Knaus UG. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* 2006;18:69–82.
255. Kosenko E, Venediktova N, Kaminsky Y, Montoliu C, Felipo V. Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication in vivo. *Brain Res* 2003;981:193–200.
256. Dhanda S, Kaur S, Sandhir R. Preventive effect of N-acetyl-L-cysteine on oxidative stress and cognitive impairment in hepatic encephalopathy following bile duct ligation. *Free Rad Biol Med* 2013;56:204–15.
257. Sathyasaikumar KV, Swapna I, Reddy PVB, Murthy CRK, Roy KR, Dutta Gupta A, et al. Co-administration of C-Phycocyanin ameliorates thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in Wistar rats. *J Neurol Sci* 2007;252:67–75.
258. Swapna I, Sathyasaikumar K V, Murthy CRK, Dutta-Gupta A, Senthilkumaran B. Changes in cerebral membrane lipid composition and fluidity during thioacetamide-induced hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 2006;98:1899–907.
259. Felipo V, Butterworth RF. Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol* 2002;67:259–79.
260. Chou Y-C, Lin S-B, Tsai LH, Tsai H-I, Lin CM. Cholesterol deficiency increases the vulnerability of hippocampal glia in primary culture to glutamate-induced excitotoxicity. *Neurochem Inter* 2003;43:197–209.
261. Kosenko E, Kaminski Y, Lopata O, Muravyov N, Felipo V. Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. *Free Rad Biol Med* 1999;26:1369–74.

262. Ghosh C, Dick RM, Ali SF. Iron/ascorbate-induced lipid peroxidation changes membrane fluidity and muscarinic cholinergic receptor binding in rat frontal cortex. *Neurochem Inter* 1993;23:479–84.
263. Roselló DM, Balestrasse K, Coll C, Coll S, Tallis S, Gurni A, et al. Oxidative stress and hippocampus in a low-grade hepatic encephalopathy model: protective effects of curcumin. *Hepatol Res* 2008;38:1148–53.
264. Pacheco GS, Panatto JP, Fagundes DA, Scaini G, Bassani C, Jeremias IC, et al. Brain creatine kinase activity is inhibited after hepatic failure induced by carbon tetrachloride or acetaminophen. *Metab Brain Dis* 2009;24:383–94.
265. Kaldis P, Hemmer W, Zanolla E, Holtzman D, Wallimann T. “Hot spots” of creatine kinase localization in brain: cerebellum, hippocampus and choroid plexus. *Develop Neurosci* 1996;18:542–54.
266. Ena S, De Kerchove d’Exaerde A, Schiffmann SN. Unraveling the differential functions and regulation of striatal neuron sub-populations in motor control, reward, and motivational processes. *Front Behav Neurosci* 2011;5:47.
267. Dumurgier J, Crivello F, Mazoyer B, Ahmed I, Tavernier B, Grabli D, et al. MRI atrophy of the caudate nucleus and slower walking speed in the elderly. *NeuroImage* 2012;60:871–8.
268. Unschuld PG, Joel SE, Liu X, Shanahan M, Margolis RL, Biglan KM, et al. Impaired cortico-striatal functional connectivity in prodromal Huntington’s Disease. *Neurosci Lett* 2012;514:204–9.
269. Horowski S, Zettl UK, Benecke R, Walter U. Sonographic basal ganglia alterations are related to non-motor symptoms in multiple sclerosis. *J Neurol* 2011;258:195–202.
270. Del Casale A, Kotzalidis GD, Rapinesi C, Serata D, Ambrosi E, Simonetti A, et al. Functional neuroimaging in obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobiol* 2011;64:61–85.
271. Chen P-J, Fan L-Y, Hwang T-J, Hwu H-G, Liu C-M, Chou T-L. The deficits on a cortical-subcortical loop of meaning processing in schizophrenia. *Neuroreport* 2013;24:147–51.

272. Li T, Li X, Zhou W, Cui X, Ma L. Dynamic susceptibility contrast-enhanced first-pass perfusion MR imaging in patients with subclinical hepatic encephalopathy. *Journal of neuroradiology. J neuroradiol* 2012;39:290–4.
273. Joardar S, Das S, Chatterjee R, Guha G, Hasmi MA. Unilateral basal-ganglia involvement likely due to valproate-induced hyperammonemic encephalopathy. *Neurol Sci* 2012;33:919–22.
274. Mousseau DD, Layrargues GP, Butterworth RF. Region-selective decreases in densities of [3H]tryptamine binding sites in autopsied brain tissue from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 1994;62:621–5.
275. Shah NJ, Neeb H, Kircheis G, Engels P, Häussinger D, Zilles K. Quantitative cerebral water content mapping in hepatic encephalopathy. *NeuroImage* 2008;41:706–17.
276. Krieger D, Krieger S, Jansen O, Gass P, Theilmann L, Lichtnecker H. Manganese and chronic hepatic encephalopathy. *Lancet* 1995;346:270–4.
277. Layrargues GP, Rose C, Spahr L, Zayed J, Normandin L, Butterworth RF. Role of manganese in the pathogenesis of portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 1998;13:311–7.
278. Rao VL, Therrien G, Butterworth RF. Choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities are unchanged in brain in human and experimental portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 1994;9:401–7.
279. Méndez M, Méndez-López M, López L, Aller MA, Arias J, Arias JL. Acetylcholinesterase activity in an experimental rat model of Type C hepatic encephalopathy. *Acta histochem* 2011;113:358–62.
280. Swapna I, SathyaSaikumar K V, Murthy CRK, Gupta AD, Senthilkumaran B. Alterations in kinetic and thermotropic properties of cerebral membrane-bound acetylcholinesterase during thioacetamide-induced hepatic encephalopathy: correlation with membrane lipid changes. *Brain Res* 2007;1153:188–95.
281. Milatovic D, Gupta RC, Aschner M. Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. *TheSciWorldJ* 2006;6:295–310.

282. Phongsamran P V, Kim JW, Cupo Abbott J, Rosenblatt A. Pharmacotherapy for hepatic encephalopathy. *Drugs* 2010;70:1131–48.
283. Bismuth M, Funakoshi N, Cadranel J-F, Blanc P. Hepatic encephalopathy: from pathophysiology to therapeutic management. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011;23:8–22.
284. Romero-Gómez M. Pharmacotherapy of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Exp Opin Pharmacother* 2010;11:1317–27.
285. Rose CF. Ammonia-lowering strategies for the treatment of hepatic encephalopathy. *Clin Pharmacol Ther* 2012;92:321–31.
286. Butterworth RF. Neuroinflammation in acute liver failure: mechanisms and novel therapeutic targets. *Neurochem Inter* 2011;59:830–6.
287. Ahboucha S, Araqi F, Layrargues GP, Butterworth RF. Differential effects of ammonia on the benzodiazepine modulatory site on the GABA-A receptor complex of human brain. *Neurochem Inter* 2005;47:58–63.
288. Ahboucha S, Coyne L, Hirakawa R, Butterworth RF, Halliwell RF. An interaction between benzodiazepines and neuroactive steroids at GABA A receptors in cultured hippocampal neurons. *Neurochem Inter* 2006;48:703–7.
289. Chameau P, Van Hooft JA. Serotonin 5-HT(3) receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res* 2006;326:573–81.
290. Gartside SE, Griffith NC, Kaura V, Ingram CD. The neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA) and its metabolites alter 5-HT neuronal activity via modulation of GABAA receptors. *J Psychopharmacol* 2010;24:1717–24.
291. Yano M, Adachi N, Liu K, Arai T. Flumazenil-induced improvement of the central dopaminergic system in rats with acute hepatic failure. *J neurosurg anesthesiol* 2005;17:69–74.
292. Laccetti M, Manes G, Uomo G, Lioniello M, Rabitti PG, Balzano A. Flumazenil in the treatment of acute hepatic encephalopathy in cirrhotic patients: a double blind randomized placebo controlled study. *Dig Liver Dis* 2000;32:335–8.

293. Van der Rijt CC, Schalm SW, Meulstee J, Stijnen T. Flumazenil therapy for hepatic encephalopathy. A double-blind cross over study. *Gastroentérol Clin Biol* 1995;19:572–80.
294. Pomier-Layrargues G, Giguère JF, Lavoie J, Perney P, Gagnon S, D'Amour M, et al. Flumazenil in cirrhotic patients in hepatic coma: a randomized double-blind placebo-controlled crossover trial. *Hepatology* 1994;19:32–7.
295. Goulenok C, Bernard B, Cadranel JF, Thabut D, Di Martino V, Opolon P, et al. Flumazenil vs. placebo in hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a meta-analysis. *Alim Pharmacol Ther* 2002;16:361–72.
296. Bosman DK, Van den Buijs CA, De Haan JG, Maas MA, Chamuleau RA. The effects of benzodiazepine-receptor antagonists and partial inverse agonists on acute hepatic encephalopathy in the rat. *Gastroenterology* 1991;101:772–81.
297. Meyer HP, Legemate DA, Van den Brom W, Rothuizen J. Improvement of chronic hepatic encephalopathy in dogs by the benzodiazepine-receptor partial inverse agonist sarmazenil, but not by the antagonist flumazenil. *Metab Brain Dis* 1998;13:241–51.
298. Yurdaydin C, Gu ZQ, Nowak G, Fromm C, Holt AG, Basile AS. Benzodiazepine receptor ligands are elevated in an animal model of hepatic encephalopathy: relationship between brain concentration and severity of encephalopathy. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;265:565–71.
299. Kalb A, Von Haefen C, Sifringer M, Tegethoff A, Paeschke N, Kostova M, et al. Acetylcholinesterase inhibitors reduce neuroinflammation and -degeneration in the cortex and hippocampus of a surgery stress rat model. *PloS One* 2013;8:e62679.
300. Ali MI, Kondreddi HDP, Veeresh B. Protective effect of 2-hydroxy-4-methoxy benzoic acid on testosterone induced benign prostatic hyperplasia in Wister rats. *Eur J Pharmacol* 2013;698:397–403.
301. Hoque A, Ambrosone CB, Till C, Goodman PJ, Tangen C, Kristal A, et al. Serum oxidized protein and prostate cancer risk within the Prostate Cancer Prevention Trial. *Cancer Prev Res* 2010;3:478–83.

302. Raso GM, Esposito E, Vitiello S, Iacono A, Santoro A, D'Agostino G, et al. Palmitoylethanolamide stimulation induces allopregnanolone synthesis in C6 Cells and primary astrocytes: involvement of peroxisome-proliferator activated receptor- α . *J Neuroendocrinol* 2011;23:591–600.
303. Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni SK. Progesterone attenuates neuroleptic-induced orofacial dyskinesia via the activity of its metabolite, allopregnanolone, a positive GABA(A) modulating neurosteroid. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 2008;32:451–61.
304. Cayatte C, Pons C, Guignonis J-M, Pizzol J, Elies L, Kennel P, et al. Protein profiling of rat ventral prostate following chronic finasteride administration: identification and localization of a novel putative androgen-regulated protein. *Mol Cell Proteom* 2006;5:2031–43.
305. Hirst JJ, Palliser HK, Yates DM, Yawno T, Walker DW. Neurosteroids in the fetus and neonate: potential protective role in compromised pregnancies. *Neurochem Inter* 2008;52:602–10.
306. Li X-M, Ma L, Yang Y-B, Shi Z-J, Zhou S-S. Clinical characteristics of fulminant hepatitis in pregnancy. *World J Gastroenterol* 2005;11:4600–3.
307. Kril JJ, Flowers D, Butterworth RF. Distinctive pattern of Bergmann glial pathology in human hepatic encephalopathy. *Mol Chem Neuropathol* 1997;31:279–87.
308. Bélanger M, Desjardins P, Chatauret N, Butterworth RF. Loss of expression of glial fibrillary acidic protein in acute hyperammonemia. *Neurochem Inter* 2002;41:155–60.
309. Gur S, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. Effects of 5-alpha reductase inhibitors on erectile function, sexual desire and ejaculation. *Exp Opin Drug Safety* 2013;12:81–90.
310. Mella JM, Perret MC, Manzotti M, Catalano HN, Guyatt G. Efficacy and safety of finasteride therapy for androgenetic alopecia: a systematic review. *Arch Dermatol* 2010;146:1141–50.

311. Traish AM, Hassani J, Guay AT, Zitzmann M, Hansen ML. Adverse side effects of 5 α -reductase inhibitors therapy: persistent diminished libido and erectile dysfunction and depression in a subset of patients. *J Sex Med* 2011;8:872–84.
312. Berthold D, Lhermitte B, Uffer M, Doerfler A. Finasteride-related Leydig cell tumour: report of a case and literature review. *Andrologia* 2012;44 Suppl 1:836–7.
313. Tresch S, Cozzio A, Kamarashev J, Harr T, Schmid-Grendelmeier P, French LE, et al. T cell-mediated acute localized exanthematous pustulosis caused by finasteride. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:589–94.
314. Garcia PV, Barbieri MF, Perobelli JE, Consonni SR, Mesquita S de FP, Kempinas W de G, et al. Morphometric-stereological and functional epididymal alterations and a decrease in fertility in rats treated with finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period. *Fertil Steril* 2012;97:1444–51.

Biografija

Dr Dušan Mladenović je rođen 05. 12. 1980. godine u Beogradu. Medicinski fakultet u Beogradu upisao je 1998. godine, a diplomirao je 29. 11. 2004. godine sa prosečnom ocenom 10 (deset). Tokom i nakon studiranja dobitnik je brojnih nagrada za uspeh ostvaren na studijama, među kojima je i nagrada iz fonda "Borko Nikitović", koja je namenjena najboljem studentu Univerziteta u Beogradu. Akademske specijalističke studije iz oblasti Eksperimentalne fiziologije i patološke fiziologije upisao je školske 2005/2006. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Završni akademski specijalistički rad pod nazivom „Uticaj genetskog polimorfizma na metabolizam alkohola“ odbranio je 09. 10. 2007. godine. Školske 2006/2007. godine upisao je doktorske studije iz Molekularne medicine na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Odlukom Izbornog veća dr Dušan Mladenović je izabran u zvanje asistenta pripravnika na Medicinskom fakultetu u Beogradu za užu naučnu oblast Patološka fiziologija u oktobru 2005. godine. U julu 2009. godine dr Dušan Mladenović je izabran za asistenta za istu naučnu oblast i u tom zvanju je i sada zaposlen na Institutu za patološku fiziologiju.

Dr Dušan Mladenović je angažovan kao istraživač saradnik na dva projekta finansirana od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije: „Uloga neuroendokrino-inflamatorne osovine u patogenezi nealkoholne masne bolesti jetre“ (#175015), čiji je rukovodilac prof. dr Tatjana Radosavljević (6 meseci) i „Razvoj animalnih modela epilepsije i testiranje konvulzivnih i antikonvulzivnih supstanci“ (#175032), čiji je rukovodilac prof. dr Olivera Stanojlović (2 meseca). Do sada dr Dušan Mladenović je objavio 88 publikacija od čega 24 rada u časopisima, koji su indeksirani u Current Contents-u i u Science Citation Index-u. Citiranost: 38.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Др Душан Младеновић

број уписа 06-DS-MM-08

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Дејство финастерида на бихејвиоралне, електроенцефалографске и ћелијске промене у хепатичној енцефалопатији изазваној тиацетамидом код пацова

- 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, 29.11.2013.

Душан Младеновић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Др Душан Младеновић

Број уписа 06-DS-MM-08

Студијски програм Молекуларна медицина

Наслов рада Дејство финастерида на бихејвиоралне, електроенцефалографске и ћелијске промене у хепатичној енцефалопатији изазваној тиаоацетамидом код пацова

Ментор Проф. др Татјана Радосављевић, Проф. др Оливера Станојловић

Потписани Душан Младеновић

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, 29.11.2013.

Душан Младеновић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Дејство финастерида на бихејвиоралне, електроенцефалографске и ћелијске промене у хепатичној енцефалопатији изазваној тиаоацетамидом код пацова

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, 29.11.2013.



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

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

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

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

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

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