

UNIVERZITET ODBRANE U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

VOJNOMEDICINSKE AKADEMIJE

Dr med. Bojana Ž. Mančić

**UTICAJ REPETITIVNE TRANSKRANIJALNE MAGNETNE
STIMULACIJE NA EKSPRESIJU NEUROTROFIČNOG FAKTORA
MOŽDANOG POREKLA, TRANSPORTERE ZA GLUTAMAT I
OKSIDATIVNO STANJE U SELEKTIVNO OSETLJIVIM MOŽDANIM
STRUKTURAMA PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2020. godine

**UNIVERSITY OF DEFENCE IN BELGRADE
MEDICAL FACULTY OF
MILITARY MEDICAL ACADEMY**

Dr Bojana Ž. Mančić MD

**INFLUENCE OF REPETITIVE TRANSCRANIAL MAGNETIC
STIMULATION ON EXPRESSION OF BRAIN DERIVED
NEUROTROPHIC FACTOR, GLUTAMATE TRANSPORTERS AND
OXIDATIVE STATUS IN SELECTIVELY VULNERABLE BRAIN
STRUCTURES IN RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

Doktorska disertacija je urađena na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu.

MENTORI:

VS prof. dr Milica Ninković, Medicinski Fakultet Vojnomedicinske akademije, Univerzitet odbrane, Beograd

ČLANOVI KOMISIJE:

Pukovnik prof. dr Tihomir Ilić, Medicinski Fakultet Vojnomedicinske akademije, Univerzitet odbrane, Beograd - predsednik komisije

VS naučni savetnik dr Ivana Stevanović, Medicinski Fakultet Vojnomedicinske akademije, Univerzitet odbrane, Beograd

Prof dr Ivana Stojanović, Medicinski Fakultet, Univerzitet u Nišu

NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

Uticaj repetitivne transkranijalne magnetne stimulacije na ekspresiju neurotrofičnog faktora moždanog porekla, transportere za glutamat i oksidativno stanje u selektivno osetljivim moždanim strukturama pacova

SAŽETAK

Uvod Repetitivna transkranijalna magnetna stimulacija (rTMS) predstavlja neinvazivnu tehniku stimulacije mozga koja na bezbedan i bezbolan način oponaša invazivne tehnike električne stimulacije koje se koriste u istraživanjima na životinjskim modelima. Primarni cilj ispitivanja i razvoja različitih protokola rTMS u humanoj populaciji bio je potencijalno lečenje oboljenja koja u osnovi nastaju zbog povećanja ili smanjenja nadražljivosti mozga. Kao poseban oblik rTMS razvijena je stimulacija teta praskovima (eng. *theta burst stimulation; TBS*) zbog prevazilaženja ograničenja konvencionalne rTMS.

Strukturne i funkcionalne promene u mozgu na celularnom i subcelularnom nivou koje nastaju usled *TBS* su brojne i nedovoljno poznate, ali je dokazano da izazivaju fenomene nalik dugotrajnoj potencijaciji i dugotrajnoj depresiji koji se nalaze u osnovi sinaptičke plastičnosti. Neurotrofični faktor moždanog porekla (eng. *brain derived neurotrophic factor, BDNF*) ima brojne uloge centralnom nervnom sistemu (CNS), uključujući procese sinaptičke plastičnosti i neurogeneze, što zajedno rezultira neuroprotekcijom.

Najrasprostranjeniji ekscitatorni neurotransmiter u CNS-u je glutamat (Glu). U fiziološkom sistemu preuzimanja Glu iz sinaptičke pukotine, njegove recirkulacije, kao i zaštite od njegove povećane koncentracije u ekstracelularnom prostoru, najvažniju ulogu imaju transporteri ekscitatornih amino-kiselina (eng. *excitatory amino acid transporters EAAT*), dok funkcija oslobađanja Glu u sinaptičku pukotinu pripada vezikularnim glutamatnim transporterima (eng. *vesicular glutamate transporters, vGluT*). S obzirom da se tehnikama rTMS direktno može uticati na povećanje, odnosno smanjenje nadražljivosti mozga, i time pokrenuti promene sinaptičke plastičnosti, studija se bavila uticajem ovakve vrste stimulacije na ekspresiju *EAAT*, *vGluT* i *BDNF*.

Oksido-reduktivni sistem (ORS) organizma čine reaktivne vrste (RV) koje predstavljaju oksidacione agense, učesnike u oštećenju biomolekula tj. nastanku oksidativnog (OS) i nitrozativnog stresa, kao i sistemi antioksidativne zaštite (AOZ). U različitim poljima istraživanja ORS se koristi kao pokazatelj bezbednosti tj. stepena oštećenja koje nastaje nakon primene različitih dijagnostičkih i terapijskih protokola. Kako u literaturi nema

dovoljno podataka o uticaju *TBS* protokola na ORS kod zdravih životinja, sprovedena studija je pratila uticaj rTMS na neuromodulatorne funkcije ORS.

Cilj Cilj istraživanja disertacije bio je utvrditi uticaj jednokratne i višekratne stimulacije dva različita dva protokola *TBS* na ekspresiju *vGluT* i *EAAT*, *BDNF*, kao i efekte na promene biohemijskih parametara oksidativnog stanja u selektivno osetljivim strukturama mozga pacova različite starosti.

Metode U istraživanje su bili uključeni mužjaci pacova *Wistar* soja, starosti 4 (mladi) i 8 (adulti) nedelja. Životinje istog uzrasnog doba podeljene su na podgrupu tretiranu jednokratno ili višekratno 10 dana (petodnevno aplikovanje/ pauza dva dana/petodnevno aplikovanje) u okviru kojih su formirane placebo (kontrolna) grupa i grupe stimulisane po protokolu *iTBS* ili *kTBS*. Stimulacija je vršena pomoću aparata *MagStim Rapid²* i kalema oblika osmice dijametra 25 mm. U uzorcima homogenata selektivno osetljivih struktura mozga (motorna kora, strijatum, hipokampus i mali mozak) određivani su parametri oksidativnog statusa. Ove strukture su korišćene za imunohistohemijsku analizu gde su metodom imunofluorescence izvršena bojenja antitelima anti-*BDNF*, anti-*vGluT-1*, anti-*GLAST*, anti-*GLT-1* i anti-*GFAP*.

Rezultati Dobijeni rezultati pokazuju:

- i) Tkivne promene u selektivno osetljivim moždanim strukturama pacova su zavisne od strukture i vremenskog obrasca primenjenog protokola *TBS*, kao i uzrasta eksperimentalnih životinja; ii) Višekratna primena *iTBS* kod mladih pacova povećava ekspresiju *vGluT-1* u strijatumu, hipokampusu i cerebelumu, dok kod adulta dovodi do smanjenja ekspresije u moždanoj kori; iii) Kod mladih životinja se sa jednokratnom *iTBS* aplikacijom povećava *GLAST* u hipokampusu i malom mozgu, dok sa višekratnim *iTBS* tretmanom raste *GLAST* u moždanoj kori a smanjuje se u hipokampusu; iv) Višekratna primena *iTBS* protokola kod adulta smanjuje ekspresiju *GLT-1* u hipokampusu i cerebelumu; v) Kod mladih životinja jednokratni *iTBS* smanjuje *BDNF* u hipokampusu, a višekratni *iTBS* smanjuje *BDNF* u moždanoj kori; vi) Višekratni *iTBS* protokol kod adulta povećava ekspresiju *GFAP* u hipokampusu i malom mozgu; vii) Jednokratna primena *kTBS* smanjuje *vGluT-1* u moždanoj kori adulta, dok višekratni protokol povećava *vGluT-1* u moždanoj kori mladih pacova; viii) Kod mladih životinja jednokratni *kTBS* smanjuje *GLAST* u hipokampusu i povećava u cerebelumu, dok kod adulta povećava ekspresiju u hipokampusu i cerebelumu; ix) Višekratni *kTBS* protokol kod mladih pacova dovodi do povećanja ekspresije *GLAST* u

moždanoj kori i strijatumu; x) Višekratni *kTBS* protokol kod adulta smanjuje ekspresiju *GLT-1* u hipokampusu i cerebelumu; xi) Jednokratna primena *kTBS* kod mladih pacova povećava *BDNF* u cerebelumu, dok višekratni *kTBS* tretman smanjuje ekspresiju u moždanoj kori i malom mozgu.

2. Primena *iTBS/kTBS* protokola ne pokreće stanje oksidativnog stresa u selektivno osetljivim moždanim strukturama mladih i adultnih pacova, ali povećava oksidativno oštećenje proteina u strijatumu adulta.

Zaključak Istraživanja u sklopu ove doktorske disertacije su doprinela saznanjima o celularnim mehanizmima delovanja jednokratnih i višekratnih *iTBS/kTBS* protokola. Takođe, rezultati studije pružaju precizne podatke o dinamici i intenzitetu uzrasno specifičnih promena u funkciji Glu i *BDNF*. Procenom oksidativnog stanja dobijen je tačan uvid u stepen metaboličkih promena u selektivno osetljivim moždanim strukturama. Kako u literaturi nema podataka na istraživanjima primene TMS na zdravim životinjama, dobijeni rezultati proširuju saznanja o ovim mehanizmima na životinjskom modelu, što uz rezultate elektrofizioloških istraživanja na zdravim dobrovoljcima, opravdava primenu rTMS kod zdravih osoba, u svrhu poboljšanja koncentracije, pažnje i kognicije. U tom smislu, moguće je i eventualno proširenje terapijskih mogućnosti za kombinovanu primenu TMS sa farmakološkim sredstvima, čime bi se poboljšala perspektiva lečenja različitih poremećaja nervnog sistema.

Ključne reči transkranijalna magnetna stimulacija, stimulacija teta praskovima, neurotrofični faktor moždanog porekla, glutamat, transporteri ekscitatornih amino-kiselina, vezikularni transporter za glutamat, parametri oksidativnog stanja, centralni nervni sistem, selektivno osetljive moždane strukture, pacovi

Naučna oblast Medicina

Uža naučna oblast Neuronauke

DOCTORAL DISSERTATION TITLE

Influence of repetitive transcranial magnetic stimulation on expression of brain derived neurotrophic factor glutamate transporters and oxidative status in selectively vulnerable brain structures in rats

ABSTRACT

Introduction Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) represents a non-invasive brain stimulation technique developed for safe and painless application in humans, mimicking the invasive electrical brain stimulation techniques in animal models. Different rTMS protocols were developed for usage in human population with primary goal to treat conditions associated with increased or reduced excitability of brain. Due to limitation of conventional rTMS protocols, special protocol was developed named theta burst stimulation (TBS). Structural and functional changes in brain on cellular and subcellular level which are induced by TBS are numerous and insufficiently researched, but results presented in many studies have shown that TBS induces its effects by mechanisms initially described as similar to classical long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD). Brain derived neurotrophic factor (BDNF) has many roles in central nervous system (CNS), including processes of synaptic plasticity and neurogenesis, together leading to neuroprotection.

Most abundant excitatory neurotransmitter in CNS is glutamate (Glu). In physiological conditions Glu uptake from synaptic cleft, its recirculation, as well as protection from its high concentration is accomplished by excitatory amino acid transporters (EAAT), while Glu release to cleft is enabled by vesicular glutamate transporters (vGluT). Due to known fact that rTMS can induce enhancement or decrease of brain excitability and induces synaptic plasticity, this study was performed in order to establish influence of this type of stimulation on EAAT, vGluT and BDNF expression.

Redox system (RS) consists of reactive species (RV) which are oxidative agents enrolled in bimolecular degradation and induction of oxidative and nitrosative stress, and antioxidative protection system (APS). In many research fields, RS parameters are estimated as indicators of safety or damage level induced by different therapeutic or diagnostic procedures. Due to insufficient data about influence of TBS protocols on RS in healthy animals, this study was keeping track of rTMS induced neuromodulatory functions of RS.

Aim Aim of this dissertation was to establish influence of two TBS protocols applied once and repeatedly on EAAT, vGluT and BDNF expression, as well as effects on

biochemical parameters of RS in selectively vulnerable brain structures in rats of different age.

Methods Study was conducted on male Wistar rats 4 weeks old (young) and 8 weeks old (adults). Animals of same age were divided in subgroups treated once or repetitively for 10 days (daily for 5 days/pause for 2 days/ daily for 5 days). In these subgroups placebo (control) group was formed, as well as groups of animals which were stimulated with iTBS or cTBS protocols. TMS was applied using a MagStim Rapid² device and a 25 mm figure-of-eight coil. Parameters of RS were measured in tissue samples of motor cortex, striatum, hippocampus and cerebellum. The same structures were used for immunofluorescence staining with anti-BDNF, anti-vGluT-1, anti-GLAST, anti-GLT-1 i anti-GFAP antibodies.

Results Following results were obtained:

1. i) Tissue changes in selectively vulnerable structures are dependent from structure and time patters of TBS protocols, as well as age of experimental animals; ii) In young rats repeated iTBS enhances vGluT-1 expression in striatum, hippocampus an cerebellum, while in adult animals expression of this transporter in reduced in motor cortex; iii) In young animals single iTBS enhances expression of GLAST in motor cortex and reduction in hippocampus; iv) In hippocampus and cerebellum of adult animals GLT-1 expression is reduced after repeated iTBS protocol; v) In young animals single iTBS reduces BDNF expression in hippocampus, while repeated iTBS reduces its expression in motor cortex; vi) Repeated iTBS protocol enhances GFAP expression in hippocampus and cerebellum in adult rats; vii) In motor cortex of adult animals single cTBS reduces vGluT-1 expression, while repeated protocol enhances its expression in motor cortex of young rats; viii) In young animals single cTBS reduces GLAST expression in hippocampus but enhances in cerebellum, while in adults enhances its expression in both of these structures; ix) Repeated cTBS protocol enhances GLAST expression in motor cortex and striatum of young rats; x) In adult animals expression of GLT-1 was reduced in hippocampus and cerebellum after repeated cTBS; xi) Single cTBS in young rats cerebellum enhances BDNF expression, while repeated cTBS protocol reduces its expression in motor cortex and cerebellum.

2. Oxidative stress in selectively vulnerable brain structures of young and adult rats is not induced by iTBS/cTBS, but its application enhances oxidative damage of proteins in adult rats striatum.

Conclusion Research results in this dissertation contributed to knowledge about cellular mechanisms induced by single and repeated iTBS/cTBS. Also, there are precise results about dynamics and intensity of age-related changes in Glu and BDNF functions. Redox status assessment gives insight about metabolic changes in selectively vulnerable brain structures. Due to insufficient data about TMS treatments of healthy animals, these results are expanding knowledge about these mechanisms in animal models, which combined with electrophysiological studies on healthy human volunteers may justify usage of rTMS treatments in order to enhance concentration and cognition. Having this in mind there is possibility to expand therapeutic odds combining TMS with pharmaceutical agents, which would give better perspective in treatment of various nervous system pathological conditions.

Keywords transcranial magnetic stimulation, theta burst stimulation, brain derived neurotrophic factor, glutamate, excitatory amino acids transporters, vesicular glutamate transporter, redox status parameters, central nervous system, selectively vulnerable brain structures, rats

Scientific field Medicine

Specific scientific field Neuroscience

<i>I UVOD</i>	1
I 1. Transkranijalna magnetna stimulacija	2
1.1. Principi magnetne stimulacije	2
I 2. Glutamatergička neurotransmisija	6
1.2.1. Receptori za glutamat	7
2.2. Transporteri za glutamat	9
2.3. Efekti <i>TBS</i> na sinaptičku plastičnost	14
I 3. Uloga astrocita u CNS-u	15
3.1. Neurotrofični faktor moždanog porekla	16
3.2. Glijalni fibrilarni kiseli protein	18
I 4. Medijatori ćelijske smrti	18
4.1. Slobodni radikali	18
4.2. Reaktivne vrste	19
4.3. Uloge RV u fiziološkim uslovima organizma	20
4.4. Sistemi zaštite od oksidativnih oštećenja	21
4.5. Biološki efekti slobodnih radikala	28
<i>II RADNE HIPOTEZE</i>	31
<i>III CILJEVI ISTRAŽIVANJA</i>	32
<i>IV MATERIJAL I METODE</i>	34
IV 1. Eksperimentalni dizajn	34
1.1. Eksperimentalne životinje	34
1.2. Eksperimentalne grupe	34
IV 2. Imunomorfološke promene u selektivno osetljivim moždanim strukturama <i>Wistar pacova</i>	36
2.1. Priprema tkiva za imunohistohemijsku analizu	36
2.2. Imunohistohemijsko markiranje	36
2.3. Analiza intenziteta imunofluorescence	37
IV 3. Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u homogenatima tkiva mozga <i>Wistar pacova</i>	38
3.1. Priprema homogenata tkiva mozga <i>Wistar pacova</i> za biohemijsku analizu	38
3.2. Određivanje koncentracije proteina u homogenatima tkiva	39
3.3. Određivanje koncentracije <i>TBARS</i> u tkivu	39

3.4. Određivanje superoksidnog anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$)	40
3.5. Određivanje aktivnosti ukupne superoksid dismutaze	40
3.6. Određivanje sadržaja ukupnih sulfhidrilnih grupa	41
3.7. Određivanje koncentracije redukovanog glutationa.....	41
3.8. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze	41
3.9. Određivanje aktivnosti glutation S-transferaze	42
IV 4. Vrsta studije, veličina uzorka i statistička obrada rezultata	42
V REZULTATI	44
V 1. Efekti TBS i kTBS na intenzitet imunofluorescence u moždanim strukturama Wistar pacova.....	44
1.1. Efekat iTBS i kTBS na ekspresiju <i>vGluT-1</i> u moždanim strukturama Wistar pacova	44
1.2. Efekat iTBS i kTBS na ekspresiju <i>GLAST</i> u moždanim strukturama Wistar pacova	46
1.3. Efekat iTBS i kTBS na ekspresiju <i>GLT-1</i> u moždanim strukturama Wistar pacova.....	48
1.4. Efekat iTBS i kTBS na ekspresiju <i>BDNF</i> u moždanim strukturama Wistar pacova.....	50
1.5. Efekat iTBS i kTBS na ekspresiju <i>GFAP</i> u moždanim strukturama Wistar pacova	52
1.6. Korelativna analiza između imunohistohemijskih parametara u selektivno osjetljivim strukturama mozga nakon primene TBS.....	54
V 2. Efekat iTBS i kTBS na promene ispitivanih biohemijskih parametara u moždanim strukturama Wistar pacova	55
2.1. Efekat iTBS i kTBS na koncentraciju <i>TBARS</i> u moždanim strukturama Wistar pacova	55
2.2. Efekat iTBS i kTBS na proizvodnju $O_2^{\cdot-}$ u moždanim strukturama Wistar pacova	57
2.3. Efekat iTBS i kTBS na aktivnost ukupne SOD u moždanim strukturama Wistar pacova	59
2.4. Efekat iTBS i kTBS na sadržaj SH u moždanim strukturama Wistar pacova	61
2.5. Efekat iTBS i kTBS na koncentracija GSH u moždanim strukturama Wistar pacova	63
2.6. Efekat iTBS i kTBS na aktivnost GR u moždanim strukturama Wistar pacova	65
2.7. Efekat iTBS i kTBS na aktivnost GST u moždanim strukturama Wistar pacova	67
2.8. Korelativna analiza između biohemijskih parametara u selektivno osjetljivim strukturama mozga nakon primene TBS.....	70
VI DISKUSIJA	71
VI 1. Promene kod jednokratno tretiranih životinja	76
1.1. Tkivne promene kod jednokratno tretiranih životinja.....	76
1.2. Biohemijske promene kod jednokratno tretiranih životinja	80
VI 2. Promene kod višekratno tretiranih životinja.....	86

2.1. Tkivne promene kod višekratno tretiranih životinja	86
2.2. Biohemijske promene kod višekratno tretiranih životinja	91
VI 3. Međustarosne razlike u tkivnim parametrima	96
<i>VII ZAKLJUČCI.....</i>	102
<i>VIII LITERATURA</i>	104

Skraćenice

EEG	Elektroencefalografija
EMP	Elektro-magnetno polje
TMS	Transkranijalna magnetna stimulacija
SPMP <i>TMS)</i>	Stimulacija pojedinačnim magnetnim pulsevima (eng. <i>single pulse</i>
rTMS	Repetitivna TMS
MT	Motorni prag (eng. <i>motor threshold</i>)
MEP	Motorni evocirani potencijali
TBS	Stimulacija teta praskovima (eng. <i>theta burst stimulation</i>)
kTBS	Kontinuirana stimulacija teta praskovima
iTBS	Intermitentna stimulacija teta praskovima
Glu	Glutaminska kiselina, glutamat
GABA	γ -aminobuterna kiselina (eng. <i>gamma aminobutyric acid</i>)
GAD	Glutamat dekarboksilaza (eng. <i>glutamic acid decarboxylase</i>)
mGluR	Metabotropni glutamatergični receptor (eng. <i>metabotropic glutamate receptor</i>)
AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol-propionatna kiselina (eng. <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartatni (eng. <i>N-methyl-D-aspartate</i>)
GluD	δ receptori (eng. <i>delta glutamate receptor</i>)
vGluT	Vezikularni glutamatni transporteri (eng. <i>vesicular glutamate transporters</i>)
EAAT	Transporteri ekscitatornih amino-kiselina (eng. <i>excitatory amino acid transporters</i>)
GLAST	Glutamat-aspartatni transporter (eng. <i>glutamate aspartate transporter</i>)
GLT-1	Glutamatni transporter -1 (eng. <i>glutamate transporter</i>)
EAAC	Nosač ekscitatornih amini-kiselina(eng. <i>excitatory amino acid carrier</i>)
LTP	Dugotrajna potencijacija (eng. <i>long term potentiation</i>)
LTD	Dugotrajna depresija (eng. <i>long term depression</i>)
KMB	Krvno-moždana barijera
NO	Azot monooksid
NTF	Neurotrofični faktor
Trk	Tropomiozin kinazni receptor

TNFr	Receptor faktora tumorske nekroze
<i>BDNF</i>	Neurotrofični faktor moždanog porekla (eng. <i>brain derived neurotrophic factor</i>)
CREB	eng. <i>cAMP response element-binding protein</i>
<i>GFAP</i>	Glijalni fibrilarni kiseli protein (eng. <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
SR	Slobodni radikali
RVK	Reaktivne vrste kiseonika
AOZ	Antioksidativna zaštita
MT	Metalotioneini
OS	Oksidativni stres
CAT	Katalaza
GPx	Glutation peroksidaza
GR	Glutation reduktaza
GST	Glutation-S-transferaza
SOD	Superoksid-dizmutaza
γ -GCS	γ -glutamilcistein-sintetaza (γ -GCS)
GS	Glutation sintetaza
FAD	Flavin adenin dinukleotid
LPO	Lipidna peroksidacija
CNS	Centralni nervni sistem
Ca ²⁺	Kalcijum
Na ⁺	Natrijum
K ⁺	Kalijum
<i>TBARS</i>	Tiobarbiturna kiselina-reagujuće supstance (eng. <i>thiobarbituric acid reactive species</i>)
O ₂ ^{•-}	Superoksid anjon radikal
SH	Sulfhidrilne grupe

I UVOD

Tokom razvoja ljudske civilizacije, ne razumevajući prirodne pojave, čovek im je davao mistična značenja i nazivao ih nadprirodnim silama. Prvobitna ljudska zajednica se sudarala sa mnogim nadprirodnim silama, a jedna od tih sila bilo je i prirodno zračenje. Ljudi su uviđali da postoje mesta koja ne prijaju životu biljaka i životinja, a ni njima samima te su ih izbegavali i označavali kao opasna po život. Jedan od izvora zračenja bio je magnet. Veruje se da ga je čovek prvobitne zajednice otkrio u ranom gvozdenom dobu, a moguće i ranije. Ne shvatajući pravu prirodu magnetizma, magnetu su se pridavala mistična svojstva korišćen je u različite, najčešće obredne svrhe. Vremenom se su se stvari izmenile, pa zapisi ukazuju da su ga stari Egipćani, Grci i Rimljani koristili u terapijske svrhe. U srednjem veku rodonačelnici medicine toga doba Klaudije Galen, Avicena i Paracelzus su upotrebljavali magnet tj. magnetno zračenje u lečenju različitih oboljenja. Krajem 17. veka osnovano je Englesko kraljevsko društvo za magnetoterapiju. Daljim razvojem nauke utvrđeno je da je planeta Zemlja jedan veliki magnet, a magnetno polje dovedeno u odnos sa električnim poljem pri čemu se stvaraju elektromagnetni talasi. Polifazne struje koje je otkrio Nikola Tesla iskorišćene su najpre kao izvor pokretanja elektromotora koji su doveli do nove industrijske revolucije. Danas postoji bezbroj uređaja u okolini čoveka koji koriste polifazne struje generišući elektromagnetna polja različite snage, posledično stvarajući elektromagnetno zagušenje tzv. elektrosmog. Kako se povećava količina ovoga zagušenja narasta i količina saznanja o štetnosti i u nekim slučajevima pogubnom uticaju elektrosmoga na zdravlje čoveka i drugih živih bića. Postoji veliki broj radova koji nesumnjivo ukazuju da različiti oblici elektromagnetnih talasa imaju korisne, ali i štetne efekte na zdravlje čoveka. Usled toga neophodno je njihovo dalje izučavanje kako bi se nepoželjne posledice predupredile.

Posebno je od interesa razmatrati delovanje elektromagnetnih polja (EMP) na rad i funkcionisanje centralnog nervnog sistema (CNS). Postoje mnoge različite metode i tehnike koje se mogu iskoristiti pri istraživanju delovanja EMP na mozak poput EEG, fMRI, PET, SPECT, evocirani potencijali, transkranijalna magnetna stimulacija (TMS).

I 1. Transkranijalna magnetna stimulacija

1.1. Principi magnetne stimulacije

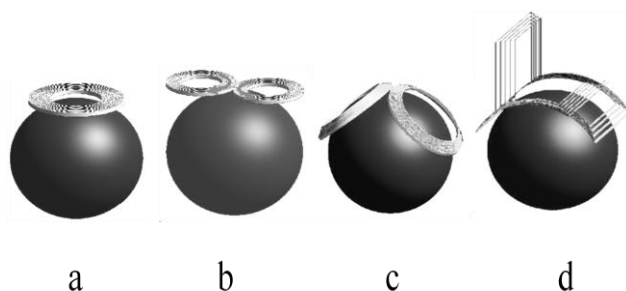
Pre više od 30 godina su *Merton* i *Morton* izazvali periferni motorni odgovor stimulišući motorna polja ljudskog mozga električnom stujom kroz neoštećenu poglavinu. Ova potencijalno korisna metoda stimulacije mozga je bila bolna i neprijatna za ispitanike što je predstavljalo ograničavajući faktor u njenoj primeni (Merton i Morton, 1980). *Barker* i saradnici su pet godina nakon toga pokazali da je moguće neinvazivno stimulisati mozak promenljivim magnetim poljem, metodom TMS, što predstavlja začetak savremene neinvazivne magnetne stimulacije (Barker i sar., 1985). Magnetna stimulacija se bazira na naučnim principima elektromagnetne indukcije koju je otkrio Mihael Faradej 1831. godine. Prilikom TMS na poglavinu se postavlja magnetni kalem, koji se sastoji od namotaja žice, kroz koji se propušta snažna naizmenična struja generisana u stimulatoru. Prolaskom struje kroz kalem indukuje se magnetno polje visokog intenziteta (u zavisnosti od stimulatora, maksimum 1,5 - 2,5 T, trajanja između 200-600 μ s) koje gotovo bez otpora prolazi kroz tkiva lobanje. Linije magnetnog polja usmerene perpendikularno na ravan kalema u neuralnim strukturama površinskih delova moždane kore indukuju slabo električno polje (do dubine 1,5-2 cm), paralelno sa ravni kalema, u kome je smer kretanja struje suprotan u odnosu na smer struje u kalemu (Hallett, 2007; Wassermann, 1998). Primena pojedinačnog TMS pulsa dovodi do promene transmembranskog potencijala, depolarizacije neuronske membrane i inicijacije akcionog potencijala, koji se propagira na uobičajeni način (Hasey, 2001). Opisanim mehanizmom se direktno pobuđuju interneuroni ili, pri višim intenzitetima stimulacije, sami piramidalni neuroni moždane kore. Takođe, TMS može indirektno da utiče na strukture udaljene od mesta stimulacije trans-sinaptičkim provođenjem (Hallett, 2007; Wassermann, 1998).

1.1.1. Tipovi kalemova i prostorne karakteristike električnog polja

Kalemovi za magnetnu stimulaciju se uobičajeno sastoje od jedne ili više dobro izolovanih spirala bakarne žice, koje su zajedno sa dodatnom elektronskom opremom smeštene u plastično kućište (Pascual-Leone i sar., 1999). Shodno potrebama za određenim osobinama električnog polja koje se njima indukuje (lokalizovanost, jačina, dubina penetracije), izrađuju se u različitim dimenzijama i geometrijskim oblicima. Kalemovi većih dimenzija stvaraju polje koje je manje lokalizovano, ali veće penetrabilnosti, dok manji

kalemovi stvaraju lokalizovanije polje koje prodire samo u površinske slojeve moždanog korteksa. Konvencionalno se upotrebljavaju kružni i kalemovi oblika osmice (leptir-kalemovi).

Kružni kalemovi se upotrebljavaju od početka TMS zbog jednostavnog geometrijskog oblika i lakog konstruisanja (slika I 1. a). Njihovom upotrebom se postiže slabo lokalizovana stimulacija moždanog tkiva, sa maksimalnom jačinom električnog polja direktno ispod spirale žice. Obzirom da su najvažnije prostorne karakteristike TMSom indukovano električnog polja njegova lokalizovanost i dubina penetracije, kalemovi oblika osmice (slika I 2. b) su konstruisani sa ciljem da se stvori usmerenije električno polje veće penetrabilnosti. Prednost ovih kalemova je pre svega dobra lokalizovanost zone stimulacije. Jačina indukovane električne struje je maksimalna direktno ispod centra kalema gde se ukrštaju dve petlje osmice, dok se struja znatno slabijeg intenziteta indukuje u tkivu ispod obe spirale žice. Upotrebom konvencionalnih TMS kalemova, indukovano električno polje je praktično ograničeno na površne slojeve moždane kore usled brzog opadanja njegovog intenziteta sa kvadratom udaljenosti. Potreba za stimulacijom dubljih moždanih struktura, tj. za povećanjem penetrabilnosti stimulacije je rezultovala konstruisanjem kalemova složenih geometrijskih oblika kao što su dvostruki konusni kalemovi (slika I 1. c), koje formiraju dve velike spirale žice fiksirane pod uglom od 95° jedna u odnosu na drugu, kao i familija *Hesed* kalemova (slika I 1. d) koji imaju kompleksan obrazac namotavanja žice i veće dimenzije. Doprinos stimulacije ovim nekonvencionalnim tipovima kalemova po pitanjima penetrabilnosti i lokalizovanosti u poređenju sa konvencionalnim predstavlja predmet daljeg istraživanja (Deng i sar., 2013; Pascual-Leone i sar., 1999; Rossi i sar., 2009).



Slika I 1. Tipovi kalemova za transkranijalnu magnetnu stimulaciju (TMS):

a) kružni kalem, b) kalem oblika osmice, c) dvostruki konusni kalem, d) *Hesed* kalem

1.1.2. TMS protokoli

U proučavanju različitih funkcija ljudskog mozga kao što su motorne funkcije, učenje, govor, vid, ali i ispitivanje mehanizama uključenih u poremećaje moždanih funkcija beleži se upotreba TMS. Osim upotrebe u istraživanjima, TMS se koristi u dijagnostici i terapiji psihijatrijskih i neuroloških poremećaja, kao i zdravoj populaciji u cilju poboljšanja kognitivnih i motornih funkcija (Hallett, 2007; Ridding i Ziemann, 2010).

Stimulacija pojedinačnim magnetnim pulsevima (SPMP, eng. *single pulse TMS*) se najčešće upotrebljava za mapiranje motorne kore i proučavanje centralnog vremena motornog provođenja. Ovom metodom se dobija „mapa“ polja na skalpu čijom se stimulacijom može izazvati odgovor (kontrakcija) ciljnog mišića (Wassermann i sar., 1992). Metoda SPMP se takođe upotrebljava za proučavanje kognitivnih defekata i određivanje polja i vremena u kojima se dešavaju specifični kortikalni procesi (Jahanshahi i Rothwell, 2000).

Tehnika sparenim pulsevima TMS podrazumeva stimulisanje jednog polja kore velikog mozga sa dva sukcesivna pulsa generisana od strane dva magnetna stimulatora, oslobođena kroz isti kalem sa kratkim interstimulusnim intervalima ili stimulisanje dva regiona kore upotrebom dva različita kalema. Studije sparenih pulseva primenjuju se kao korisna dijagnostička procedura u proučavanju patoloških interhemisferičnih i intrakortikalnih interakcija u različitim neurološkim i psihijatrijskim oboljenja u realnom vremenu (Rossi i sar., 2009; Wittenberg i sar., 2007).

1.1.2.1 Repetitivna TMS

Tehnika kojom se nad određenim moždanim regionom aplikuju nizovi magnetnih pulseva frekvencije u rasponu od 0,2 Hz do 50 Hz naziva se repetitivna TMS (rTMS). Konvencionalni protokoli pri kojima se primenjuju niskofrekventni nizovi stimulusa (≤ 1 Hz) se nazivaju niskofrekventna ili spora rTMS, dok se visokofrekventnom ili brzom rTMS nazivaju protokoli sa frekvencijom većom od 5Hz. Ovakva klasifikacija je zasnovana na različitim fiziološkim efektima i stepenu rizika koji je udružen sa nisko ili visokofrekventnom stimulacijom (Hallett, 2007; Rossi i sar., 2009). Nizovi pulseva u niskofrekventnim protokolima se uglavnom aplikuju kontinuirano bez pauze, dok se pri visokofrekventnim protokolima aplikuju u grupama koje se ponavljaju nakon pauze (perioda bez stimulacije) (Rossi i sar., 2009).

Tri faktora koja najviše utiču na efekat rTMS su intenzitet, frekvencija i trajanje stimulacije. Efekti rTMS su u početku najviše ispitivani na nivou motorne kore i kortikospinalnog puta zdravih ljudi. U ovim studijama je intenzitet stimulacije definisan kao procenat individualnog motornog praga (eng. *motor threshold*- MT; predstavlja najniži intenzitet TMS koji se aplikuje nad motornom korom koji može da izazove mišićni odgovor na kontralateralnoj šaci u 5 od 10 proba), a efekat rTMS na escitabilnost se procenjavao merenjem amplitude motornih evociranih potencijala (eng. *motor-evoked potentials*- MEP; predstavljaju potencijale koji se registruju u mišićima nakon direktne stimulacije motorne kore). Na ovaj način je pokazano da visokofrekventna rTMS, uglavnom povećava amplitude MEP-a, a time smatra se i ekscitabilnost (Arai i sar., 2007; Gilio i sar., 2007; Jung i sar., 2008; Rizzo i sar., 2004), dok niskofrekventna rTMS snižava amplitude MEP-a tj. ispoljava inhibitorne efekte (Chouinard i sar., 2003; Taylor i Loo, 2007; Todd i sar., 2006), koji prevazilaze period stimulacije. Na veličinu i trajanje ovih naknadnih efekata izuzetno utiču intenzitet i dužina trajanja stimulacije, tako da veći intenzitet i duže trajanje stimulacije uglavnom izaziva dugotrajnije i izraženije povećanje, odnosno smanjenje kortikalne ekscitabilnosti (Fitzgerald i sar., 2006; Hoogendam i sar., 2010).

Osim promena funkcije motorne kore, primena rTMS može kod životinja reverzibilno da izazove promenu ponašanja i ispolji efekat na procese učenja (Funke i Benali, 2011), a u nizu istraživanja primenjuje se u tretmanu neuroloških ili psihijatrijskih bolesti, i to pre svih depresije, a potom cerebrovaskularnog insulta, Alchajmerove demencije, Parkinsonove bolesti, shizofrenije, amiotrofične lateralne skleroze (Chou i sar., 2015; George i sar., 2010; Lindenberg i sar., 2010; Rabey i sar., 2013; Vucic i sar., 2013; Zanette i sar., 2008). U manjem broju studija na zdravim dobrovoljcima, kao i u studijama sa bolesnim osobama, pokazana je znatna varijabilnost odgovora na rTMS. Kod zdravih dobrovoljaca, rTMS može da destabilizuje procese konsolidacije pamćenja, ali su u zavisnosti od protokola verifikovani i pozitivni efekti rTMS na poboljšanje kognitivnih i motornih funkcija (Luber i sar., 2007; Yamanaka i sar., 2010).

1.1.2.2. Stimulacija teta praskovima

Primarni cilj ispitivanja i razvoja različitih protokola rTMS u humanoju populaciji je predstavljao potencijalno lečenje oboljenja koja u osnovi nastaju zbog povećanja ili smanjenja nadražljivosti mozga. Smatralo se da bi pozitivni efekti tretmana bili ostvareni

indukovanjem sinaptičke (neuralne) plastičnosti, koja predstavlja bazični mehanizam adaptacije mozga na promene koje dolaze iz spoljašnje sredine ili samog organizma. Uprkos dobroj ideji, upotreba konvencionalnih obrazaca rTMS je dala slabe rezultate koji su se ogledali u velikoj varijabilnosti efekata i blagom poboljšanju simptoma koji su kratkotrajni. Razlozi za slabe rezultate su bili potreba za dugotrajnom i produženom stimulacijom, kao i primenom relativno niskih frekvencija i intenziteta stimulacije iz sigurnosnih razloga. Kao poseban oblik rTMS razvijena je stimulacija teta praskovima (eng. *theta burst stimulation*; *TBS*) upravo zbog prevazilaženja ovih ograničenja (Huang i sar., 2005).

Sam teta prasak u animalnim studijama je razvijen da bi imitirao fiziološke obrasce neuronskog pražnjenja koji se dešavaju u hipokampusu pacova dok istražuje nepoznato okruženje (Diamond i sar., 1988). *TBS* predstavlja strukturirani oblik rTMS pri kojoj se grupe od po 3 stimulusa sa interstimulusnim intervalom od oko 10 ms i frekvencijom 50 Hz ponavljaju približno svakih 170 ms tako da je ukupno trajanje ciklusa oko 200 ms, što predstavlja ekvivalent od 5 Hz (teta opseg frekvencija u elektroencefalografiji). Konvencionalna rTMS podrazumeva aplikovanje pravilno ponavljanih pojedinačnih TMS pulseva (isključivo jedan obrazac periodičnosti), dok u slučaju *TBS* postoje dva osnovna i najčešće upotrebljavana obrasca stimulacije, sa potencijalom bidirekcionne modulacije nadražljivosti motorne kore, koji se nazivaju intermitentni (*iTBS*) i kontinuirani obrazac (*kTBS*). Prva saznanja o efektima ovih protokola su dobijena ispitivanjem ekscitabilnosti motorne kore ljudi, merenjem amplitude MEP-a, čime je pokazano da *iTBS* dovodi do povećanja amplitude, dok *kTBS* dovodi do njene redukcije u trajanju dužem od 20 min nakon stimulacije. Slični rezultati su dobijeni i u kasnijim studijama, pa je opšte prihvaćeno da *iTBS* podstiče ekscitacijsku neurotransmisiju, a da *kTBS* izaziva njenu supresiju (Hoogendam i sar., 2010).

I 2. Glutamatergička neurotransmisija

Patofiziološke osnove različitih oboljenja i patoloških stanja CNS su oštećenje selektivnih populacija neurona, pri čemu je tačna etiologija patoloških procesa još uvek nepoznata. Glutaminska kiselina (Glu) je neesencijalna amino-kiselina čiji su karboksilatni anjoni i soli poznati kao glutamat (Glu). U organizmu sisara uglavnom je prisutan u CNS gde ima ulogu najvažnijeg ekscitatornog neurotransmitera i glasnika.

Nakon oslobađanja iz presinaptičkih terminala, Glu se transportuje u astrocite, gde se konvertuje u glutamin, aktivnošću enzima glutamin sintetaze. Potom se vraća u neurone, podleže deaminaciji u Glu posredstvom fosfat zavisne glutaminaze, čime se kompletira glutamat-glutaminski ciklus (slika I 2.). Obzirom da Glu ne prolazi krvno-moždanu barijeru (KMB), za održavanje njegove adekvatne koncentracije u tkivu CNS neophodna je kontinuirana sinteza i to isključivo *de novo* sinteza u astrocitima. Katalitičkim dejstvom astrocit specifičnog enzima piruvat karboksilaze i piruvat dehidrogenaze koji konvertuju dva molekula piruvata dobijena iz glukoze sintetiše se novi molekul Glu.

U mozgu je Glu takođe prekursor za sintezu γ -aminobuterne kiseline (eng. *gamma aminobutyric acid*; *GABA*) koja nastaje njegovom dekarboksilacijom u reakciji katalizovanoj glutamat dekarboksilazom (eng. *glutamic acid decarboxylase*; *GAD*). Zajednički metabolički put Glu i *GABA* je od izuzetnog značaja obzirom da predstavljaju glavni ekscitacijski, odnosno inhibicijski neurotransmiter. Takođe u astrocitima Glu može biti konvertovan u α -ketoglutarat, a potom uključen u Krevsov ciklus. Procenjuje se da se ovim putem oksiduje oko 30% ukupnog pula Glu u mozgu. Pretpostavka je da na taj način Glu služi kao alternativni izvor adenozin-3-fosfata (*ATP*) u odsustvu glukoze (Mehta i sar., 2013; Schousboe i sar., 2014). Povišena ekstracelularna koncentracija Glu dovodi do njegove povećane oksidacije (Torres i sar., 2013).

Glutamat je glavni neurotransmiter koji ostvaruje brzu ekscitatornu sinaptičku transmisiju i ima izuzetno važnu ulogu u procesima sinaptičke plastičnosti, učenja, memorije i drugih kognitivnih funkcija. Njegova intracelularna koncentracija je oko 10^3 puta veća nego u ekstracelularnom prostoru, što je od izuzetnog značaja jer se na taj način sprečava preterana stimulacija glutamatnih receptora i održava normalna funkcija mozga. Izuzetno je važno ne samo da se Glu nalazi u precizno određenoj koncentraciji, na pravom mestu u pravo vreme, već i da ciljne ćelije ispoljavaju adekvatnu osetljivost na njegovo prisustvo. Spoljašnji i unutrašnji faktori koji remete bilo koji od ovih činilaca neophodnih za održavanje normalne glutamatergičke transmisije mogu dovesti do oštećenja funkcije mozga (Goto i sar., 2009; Mehta i sar., 2013).

1.2.1. Receptori za glutamat

Svoje efekte Glu ispoljava aktivacijom dve klase receptora i to ligandom kontrolisanih jonskih kanala (jonotropni receptori) i receptora spregnutih sa G-proteinom (metabotropni

receptori). Vezivanjem za jonotropne receptore Glu ostvaruje brzu i kratkotrajnu ekscitacijsku transmisiju, dok sporo i dugotrajno dejstvo ispoljava vezivanjem za metabotropne receptore.

Do sada je identifikovano osam tipova metabotropnih receptora (eng. *metabotropic glutamate receptors*, mGluR) sa određenim podtipovima koji su na osnovu strukture i funkcije podeljeni u tri grupe. Prva grupa receptora (mGluR1 i mGluR5) je lokalizovana na postsinaptičkoj membrani i njihovom aktivacijom Glu moduliše sopstveno dejstvo i indukuje sinaptičku plastičnost. Aktivacijom receptora druge (mGluR2 i mGluR3) i treće (mGluR4, mGluR6-8) grupe lokalizovanim dominantno na presinaptičkoj membrani, Glu inhibira sopstveno oslobađanje i takođe reguliše procese sinaptičke plastičnosti (Mukherjee i Manahan-Vaughan, 2013; Nicoletti i sar., 2011). Pojedine klase mGluR su identifikovane na ćelijama glije kao i imunskim ćelijama (Nicoletti i sar., 2011).

Jonotropni glutamatergički receptori (eng. *ionotropic glutamate receptors*, iGluR) su razvrstani u četiri grupe i to su α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol-propionatni (eng. *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*, AMPA), N-metil-D-aspartatni (eng. *N-methyl-D-aspartate*, NMDA), kainatni (eng. *kainic acid*, *kainate*, KA) i δ receptori (eng. *delta glutamate receptor*, GluD). Glutamatergički AMPA receptori su prisutni na većini postsinaptičkih neurona i njihovom aktivacijom dolazi do depolarizacije membrane i brze ekscitacijske transmisije. Za razliku od AMPA receptora koji su odgovorni za brze i kratkotrajne efekte Glu, NMDA receptori lokalizovani na presinaptičkoj i postsinaptičkoj membrani dovode do dugotrajnih efekata, tako što omogućavaju ulazak kalcijuma (Ca^{2+}) koji pokreće unutarćelijske glasničke sisteme, usled čega dolazi do trajnih promena koje predstavljaju biohemijску osnovu sinaptičke plastičnosti (Jeremy M. Henley, 2013). Glutamatergički KA receptori lokalizovani i pre- i postsinaptički učestvuju u sinaptičkoj plastičnosti, takođe inhibicijom GABA-ergičke transmisije potenciraju ekscitatornu neurotransmisiju (Jin i Smith, 2011). Glutamatergički GluD receptori su uvršteni u iGluR isključivo zbog sličnosti aminokiselinske sekvence subjedinica, iako oni ne vezuju Glu niti imaju funkciju ligi om kontrolisanih jonskih kanala (Orth i sar., 2013). Skorija ispitivanja na glodarima pokazuju da GluD1 ima najveću ekspresiju u prednjem mozgu i hipokampusu, a nešto nižu u malom mozgu, dok je GluD2 dominantno ekspimiran na Purkinjeovim ćelijama malog mozga. Aktivacija GluD1 je izuzeto važna za procese sinaptogeneze, dok GluD2 imaju

značajnu ulogu u procesu sinaptičke plastičnosti i motornog učenja u malom mozgu (Khan, 2016).

2.2. Transporteri za glutamat

Masovna aktivnost neurona koja se dešava pri rTMS dovodi do promene u količini oslobođenog Glu. Njegove sinaptičke funkcije su regulisane na nekoliko nivoa, od transporta u sinaptičke vezikule, oslobađanja u sinaptičku pukotinu do preuzimanja od strane neurona i glija ćelija (Zink i sar., 2010). Transport Glu se vrši posredstvom različitih familija transportera, koji su na osnovu mesta delovanja podeljeni na intracelularne i membranske. Membranski transporteri su podeljeni u nekoliko grupa prema afinitetu i brzini preuzimanja Glu, smeru u kome se Glu transportuje (u ili van ćelije), zavisnosti od gradijenta Na^+ i K^+ , sposobnosti transporta drugih amino-kiseline kao što su *GABA*, glicin i cistein. Intracelularni transporteri vrše dalju distribuciju Glu u ćeliji, a do sada su najbolje opisani mitohondrijalni i vezikularni transporteri za Glu (Danbolt, 2001).

2.2.1. Vezikularni transporteri za glutamat

Pre oslobađanja u sinaptičku pukotinu Glu u presinaptičkom terminalu mora najpre biti transportovan iz aksoplazme u sinaptičke vezikule. Preuzimanje Glu u sinaptičke vezikule je omogućeno protonskim elektrohemijским gradijentom koji se u vezikulama održava aktivnošću vakuolarnog tipa adenzin trifosfataze (*ATP-aza*). Vezikularno nakupljanje Glu vrše transporteri nazvani vezikularni glutamatni transporteri (eng. *vesicular glutamate transporters*, *vGluT*) koji pripadaju superfamiliji transportera rastvorenih supstanci (eng. *solute carrier transporters*, *SLC*), i to familiji *SLC17* (Verkhatsky i sar., 2016). Klasifikovani su u tri grupe; vezikularni glutamatni transporter 1 (*vGluT-1*), vezikularni glutamatni transporter 2 (*vGluT-2*) i vezikularni glutamatni transporter 3 (*vGluT-3*) (Slika I 2.). Oni su ključni anatomski i funkcionalni markeri glutamatergičke transmisije i promena njihove ekspresije modifikuje sadržaj Glu u sinaptičkim vezikulama i stoga menja snagu ekscitatorne neurotransmisije (Hnasko i Edwards, 2012; Linguz-Leczna, 2007).

Gotovo 80% ukupnog vezikularnog transporta Glu u adultnom mozgu vrši *vGluT-1* koji ima visoku ekspresiju u neuronima motorne i kore malog mozga kao i hipokampusu, dok se u subkortikalnim strukturama dominantno nalazi *vGluT-2* (El Mestikawy i sar., 2011). Ova dva transportera su retko kolokalizovana na istim sinaptičkim vezikulama ili sinaptičkim terminalima bilo privremeno (u pojedinim periodima razvoja) ili trajno (tokom celog života).

U brojnim regiona mozga *vGluT-3* je eksprimiran, na malom broju neurona koji uglavnom ne pripadaju glutamatergičkom transmitterskom sistemu, pa je tako prisutan na holinergičkim interneuronima strijatuma, GABA-ergičkim košarastim ćelijama kore velikog mozga i hipokampusa i serotoninergičkim neuronima rafe jedara i dominantno je uključen u modulaciju lokalne neurotransmisije (Linguz-Leczmar, 2007; Vigneault i sar., 2015). Bitno je naglasiti da se i *vGluT-1* i *2* takođe eksprimiraju na neglutamatergičkim neuronima (El Mestikawy i sar., 2011; Ren i sar., 2011; Zier i sar., 2010). Značaj prisustva *vGluT* na sinaptičkim vezikulama neglutamatergičkih neurona je nedovoljno poznat, ali se u nekim ispitivanjima pokazalo da oni stvaraju uslove u kojima dolazi do povećanog unosa primarnog neurotransportera u sinaptičke vezikule, i posledično povećanog oslobađanja u sinaptičku pukotinu. Ovi nalazi govore u prilog tome da *vGluT* zapravo moduliraju sinaptičku aktivnost primarnog neurotransmitera (Munster-Wiowski i sar., 2016).

Sve tri grupe *vGluT* se osim u neuronima mozga eksprimiraju u kičmenoj moždini, perifernom nervnom sistemu, ali i na drugim populacijama ćelija kao što su astrociti, fotoreceptorske ćelije retine, ćelije Langerhansovih ostrvaca pankreasa, kosti itd. (Linguz-Leczmar, 2007; Verkhratsky i sar., 2016).

Ispitivanja na miševima kojima nedostaje gen za *vGluT-1* su pokazala da se oni u prve dve nedelje nakon rođenja normalno razvijaju, a nakon treće nedelje zaostaju u rastu, ispoljavaju poremećaje pokreta, ponašanja, memorije i učenja. Takođe je pokazano da u CA1 regionu hipokampusa ovih životinja u prvoj nedelji nakon rođenja postoji prolazna ekspresija *vGluT-2*. Na osnovu ovih istraživanja zaključilo se da *vGluT-1* i *2* imaju značajnu ulogu u funkcionisanju gotovo svih velikih glutamatergičkih neuralnih krugova, a da je *vGluT-2* naročito važan za rani razvoj i preživljavanje (Fremeau i sar., 2004; Wojcik i sar., 2004).

Smatra se da menjajući nivo ekspresije i ugradnje *vGluT* u sinaptičke vezikule zapravo može da se utiče na stepen punjenja vezikula Glu, što znači da se na ovaj način može regulisati količina Glu koja se preuzima i oslobađa u sinaptičku pukotinu. Takođe, promenom ekspresije se utiče i na brzinu preuzimanja Glu iz aksoplazme (Wilson i sar., 2005). Obzirom da oslobađanje Glu iz pojedinačne sinaptičke vezikule nije dovoljno za saturaciju postsinaptičkih receptora i za izazivanje akcionog potencijala, smatra se da *vGluT* modulacijom oslobađanja Glu utiču na snagu sinaptičke transmisije i doprinose nastanku presinaptičke plastičnosti.

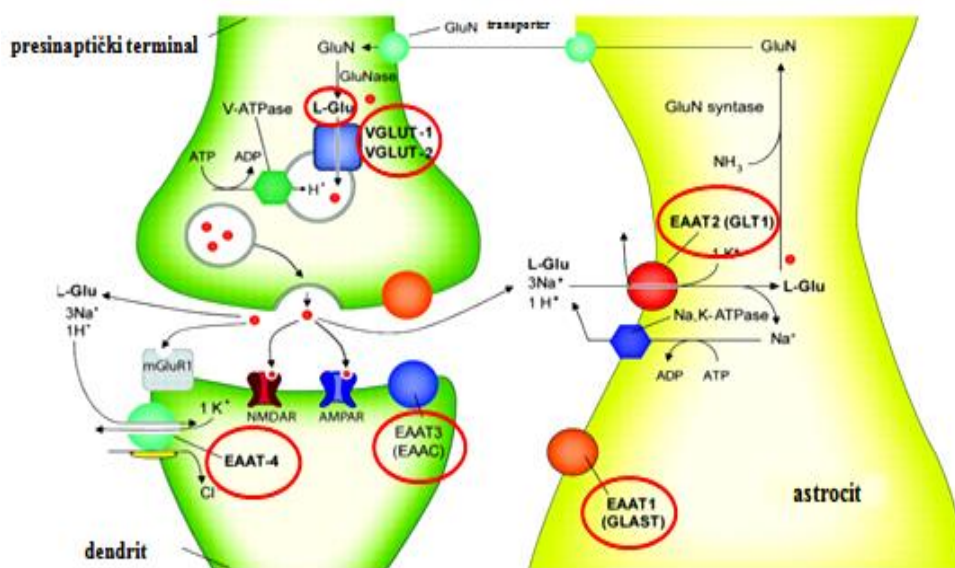
Smanjena ekspresija *vGluT-1* kao dominantnog vezikularnog transportera je verifikovana *in vitro* i *in vivo* studijama na modelima Alchajmerove bolesti, depresije, šizofrenije (Oni-Orisan i sar., 2008; Rodriguez-Perdigon i sar., 2016; Zink i sar., 2010), dok je u epilepsiji njegova ekspresija povećana (Kim i sar., 2005).

Izmenjena funkcija *vGluT* najverovatnije ne predstavlja primarni uzrok različitih neuropsihijatrijskih oboljenja, već posledicu zbog koje su glutamatergička neurotransmisija i procesi sinaptičke plastičnosti kompromitovani, čime se dodatno povećava osetljivost različitih moždanih struktura prema faktorima koji u osnovi dovode do ovih oboljenja.

2.2.2. Transporteri ekscitatornih amino-kiselina

Transporteri ekscitatornih amino-kiselina (eng. *excitatory amino acid transporters*; *EAAT*) lokalizovani na plazma membrani, omogućavaju brzo preuzimanje Glu iz sinaptičke pukotine što predstavlja značajan proces u sprečavanju efekata ekscitotoksičnosti, zaštiti ćelija od oksidativnog stresa, i regulisanju intracelularne koncentracije Glu. Njihov raniji naziv je bio Na^+ zavisni transporteri visokog afiniteta, da bi se razlikovali od tzv. transportera niskog afiniteta. Ovi transporteri održavaju nisku koncentraciju Glu u blizini receptora, sprečavaju njihovu hroničnu aktivaciju i onemogućavaju prelivanje transmitera između različitih sinapsi i njihovu aktivaciju. Transport Glu je zavisan od koncentracionog gradijenta Na^+ tako da se pri svakom transportnom ciklusu sa molekulom Glu kotransportuju tri molekula Na^+ i jedan proton, a molekul K^+ se kontratransportuje (Danbolt, 2001; Robinson i Jackson, 2016).

U mozgu pacova je izolovano pet grupa *EAAT* koji su nazvani transporter ekscitatornih amino-kiselina 1 (eng. *glutamate aspartate transporter*; *GLAST*), transporter ekscitatornih amino-kiselina 2 (eng. *glutamate transporter*; *GLT-1*), transporter ekscitatornih amino-kiselina 3 (eng. *excitatory amino acid carrier 1*, *EAAC1*), transporter ekscitatornih amino-kiselina 4 (eng. *excitatory amino acid transporter 4*, *EAAT4*) i transporter ekscitatornih amino-kiselina 5 (eng. *excitatory amino acid transporter 5*, *EAAT5*) (slika I 2.)



Slika I 2. Transporteri za glutamat i metabolizam glutamata u sinapsi

Transporteri ekscitatornih amino-kiselina (*EAAT*), transporter ekscitatornih amino-kiselina 1 (*GLAST*), transporter ekscitatornih amino-kiselina 2 (*GLT-1*), transporter ekscitatornih amino-kiselina 3 (*EAAC1*), transporter ekscitatornih amino-kiselina 4 (*EAAT4*); vezikularni glutamatni transporter 1 (*vGluT-1*), vezikularni glutamatni transporter 2 (*vGluT-2*); L-glutamat (L-Glu); Glutamin (GluN); glutamin sintetaza (*GluN synthase*); fosfat zavisna glutaminaza (*GluNase*); V adenzintri fosfataza (*V-ATPase*); adenzin trifosfat (*ATP*); adenzin difosfat (*ADP*); amino grupa (NH_3); jon natrijuma (Na^+); jon kalijuma (K^+); jon vodonika (H^+); jon hlora (Cl^-); natrijum-kalijum adenzintri fosfataza (*Na, K, ATPase*); α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol-propionatni (*AMPA*); N-metil-D-aspartatni (*NMDA*); metabotropni receptor za glutamat (*mGluR1*). Preuređeno po (Benarroch, 2010)

Većina Glu iz sinaptičkih pukotina se preuzima aktivnošću *GLAST* i *GLT-1*. Na astrocitima i oligodendrocitima je eksprimiran *GLAST*, dok je *GLT-1* mnogo više prisutan na astrocitima, ali i na aksonskim terminalima (Furness i sar., 2008). *GLT-1* je dominantan transporter i odgovoran je za više od 90% ukupnog preuzimanja Glu iz sinaptičke pukotine, dok *GLAST* ima daleko manji doprinos u preuzimanju i to najviše u Bergmanovoj glijii malog mozga gde je oko šest puta više eksprimiran u poređenju sa *GLT-1* (Danbolt, 2001). S tim u vezi je podatak da miševi koji imaju deleciju gena za *GLT-1* pokazuju veliku sklonost ka nastajanju epileptičnih napada i umiru rano tokom razvoja, dok delecije gena za *GLAST* dovodi do poremećaja motorne koordinacije i abnormalnosti u hodu. Nekoliko sudija je pokazalo da su *GLAST* i *GLT-1* kolokalizovani sa brojnim proteinskim molekulima kao što su Na^+/K^+ ATP-aza, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmenjivač, neki glikolitički enzimi i mitohondrijalni proteini. Smatra se da je smisao kolokalizacije funkcionalno povezivanje transportera sa ovim proteinima čime je omogućeno održavanje koncentracionog gradijenta Na^+ i sinteza dovoljne količine *ATP*-a, neophodnih za adekvatan transport Glu.

Transporter *EAAC1* se dominantno nalazi na telima i dendritima ekscitatornih i inhibitornih neurona mozga ali i na drugim ćelijama CNS-a (oligodendrociti, epitelne ćelije horoidnog pleksusa) i drugih organskih sistema (tanko crevo i bubrezi) (Danbolt, 2001; Holmseth i sar., 2012). Ovaj transporter se za razliku od drugih *EAAT* relativno brzo mobilize iz citoplazme u plazma membranu. Pored Glu, *EAAC1* preuzima iz ekstracelularnog prostora amino-kiselinu cistein tako da njegova delecija dovodi do smanjenja koncentracije glutaciona (za čiju je sintezu ova amino-kiselina esencijalna) i posledične smrti neurona zbog smanjene antioksidativne zaštite (Aoyama i Nakaki, 2013).

Transporter *EAAT4* je uglavnom eksprimiran na Purkinjeovim ćelijama malog mozga, ali je njegovo prisustvo pokazano i u drugim delovima mozga dok se *EAAT5* nalazi na fotoreceptorima i bipolarnim ćelijama retine. U funkcionalnom smislu smatra se da su oba transportera malog kapaciteta i afiniteta za Glu i anjonski kanali velike sprovodljivosti za hloridne jone (Machtens i sar., 2015; Schneider i sar., 2014).

Narušena funkcija *EAAT* je uočena u brojnim patološkim stanjima i bolestima kao što su Parkinsonova i Alchajmerova bolest, amiotrofična lateralna skleroza, ishemija, šizofrenija i druge bolesti (Danbolt, 2001; Krzyzanowska i sar., 2014; Shan i sar., 2013; Zhang i sar., 2016). Smanjena ekspresija, gubitak funkcije *EAAT* ili reverzno oslobađanje glutamata iz citoplazme u ekstracelularni prostor, za posledicu može imati povećanu aktivaciju glutamatnih receptora, povećanu potrošnju energije i produkciju slobodnih kiseoničnih radikala, što dovodi do oštećenja CNS-a. Smatra se da su redoks modulacija glutamatnih transportera, poremećena transkripcija, translacija ili postranslaciona obrada u osnovi promena njihove funkcije. Gubitak ovih transportera takođe može biti uzrokovan oštećenjima neurona, jer njihova ekspresija zavisi od solubilnih faktora koje produkuju neuroni (Danbolt, 2001).

Iz svega navedenog se može zaključiti da *EAAT* imaju delikatniju ulogu od jednostavnog uklanjanja Glu i značajni su za regulaciju sinaptičke transmisije. Promena njihovih funkcionalnih svojstava, lokalizacije i nivoa ekspresije su izuzetno važni za funkcionisanje nervnog sistema u fiziološkim uslovima, ali i u različitim patološkim stanjima.

2.3. Efekti *TBS* na sinaptičku plastičnost

Strukturne i funkcionalne promene u mozgu na celularnom i subcelularnom nivou koje nastaju usled *TBS* su brojne i nedovoljno poznate, ali uglavnom upućuju na promene u sinaptičkoj plastičnosti (Pell i sar., 2011).

Sinaptička plastičnost je proces modulacije sinaptičke snage koji zavisi od njene prethodne aktivnosti. Eksperimentalno je najpre pokazana na sinapsama perforantnog puta hipokampusa zeca (Bliss i Lomo, 1973), a nakon toga i u delovima kore velikog mozga, malom mozgu, talamusu i subkortikalnim strukturama (Bear, 1996; Bender i sar., 2009; Castro-Alamancos i Calcagnotto, 1999; Chen i sar., 2009; Huang i Ki el, 1998; Robbe i sar., 2002). Osnovni mehanizam sinaptičke plastičnosti je baziran na Hebovoj teoriji (eng. *Hebbian theory*) prema kojoj centralnu ulogu u ovim promenama ima ponavljana aktivacija postsinaptičkog neurona od strane presinaptičkog aksona. Najvažnije karakteristike ovog odnosa između dva neurona su prostorno i vremenski precizno usaglašavanje procesa na presinaptičkoj i postsinaptičkoj membrani, specifičnost ulaznog signala i sposobnost međusobnog udruživanja (Hebb, 1949; Pell i sar., 2011). Sinaptičke promene se eksperimentalno ispoljavaju u dva suprotna oblika; kao povećanje snage i funkcije sinapse kroz mehanizam dugotrajne potencijacije (eng. *long term potentiation; LTP*) ili kao proces smanjenja snage i funkcije koji se naziva dugotrajna depresija (eng. *long term depression; LTD*) (Pell i sar., 2011). Većina dosadašnjih istraživanja je pokazala da visokofrekventni protokoli rTMS dovode do pojave fenomena sličnih *LTP*-ju, dok niskofrekventni protokoli izazivaju *LTD*-ju slične fenomene (Pell i sar., 2011).

Brojni mehanizmi dovode po pojave *LTP* i *LTD*, ali se osnovne promene dešavaju na nivou ekscitatornih glutamatergičkih sinapsi kao i na udruženim *AMPA* i *NMDA* receptorima. Glutamat oslobođen iz presinaptičkog aksonskog terminala vezuje se za *AMPA* receptore i izaziva hipopolarizaciju postsinaptičkog neurona usled koje se uklanja blokada *NMDA* receptora jonima magnezijuma (Mg^{2+}) i omogućuje influks jona Ca^{2+} . U zavisnosti od stepena i brzine influksa Ca^{2+} aktivira se kompleksna kaskada biohemijjskih procesa uključujući fosforilaciju, defosforilaciju, sintezu proteina i gensku transkripciju. Ovi događaji konačno dovode ili do povećanja snage sinaptičke transmisije ili do njenog smanjenja u zavisnosti od toga da li kao krajnji efekat imaju povećanje ili smanjenje ekspresije *AMPA* receptora na postsinaptičkoj membrani (Hoogendam i sar., 2010; Hugarir i Nicoll, 2013).

Mehanizam indukovanja sinaptičke plastičnosti Putem *TBS* razlikuje se od fizioloških procesa *LTP* i *LTD*. Za razliku od prethodno opisanih fenomena koji nastaju usled prostorno i vremenski precizno usaglašenih procesa na presinaptičkoj i postsinaptičkoj membrani, *TBS* izaziva istovremenu neselektivnu aktivaciju velikog broja aksona, presinaptičkih i postsinaptičkih terminala kao i antidromnu aktivaciju soma i dendrita, indukujući masovnu stimulaciju velikog broja neurona (Hoogendam i sar., 2010; Pell i sar., 2011). Ipak efekti *iTBS* i *KTBS* na promenu amplitude MEP-a su blokirani antagonistima *NMDA* receptora kao što su memantin i deksmetorfan, dok blokator L-tipa voltažno zavisnih Ca^{2+} kanala nimodipin izaziva dozno zavisno opadanje efekata *KTBS* (Huang i sar., 2007; Wankerl i sar., 2010). Obzirom da su *NMDA* receptori i Ca^{2+} kanali ključni molekuli postsinaptičke membrane uključeni u indukciju sinaptičke plastičnosti, ovi rezultati su potvrda da efekti *TBS* koji se održavaju nakon perioda stimulacije predstavljaju fenomene nalik *LTP* i *LTD*.

I 3. Uloga astrocita u CNS-u

Nemački naučnik poznat kao „otac moderne patologije” Rudolf Virhov (eng. *Rudolf Virchow*) je dao prvi opis glijalnih ćelija kao „supstance koja se nalazi između nervnih delova, koja ih drži zajedno i u manjem ili većem stepenu daje im formu“, a astrocite kao podvrstu ovih ćelija je prvi imenovao Mihael Fon Lenhosek (eng. *Michael von Lenhossek*) (Lenhossek, 1891; Virchow, 1858). Početkom dvadesetog veka istraživanja na polju glijalnih ćelija su bila zanemarljiva, jer je akcenat bio na ispitivanju uloga neurona za koje se smatralo da su jedini konstituenti signalizacije u moždanom tkivu. Nakon više decenija, u fokusu istraživanja se nalaze glijalne ćelije, naročito astrociti za koje se dokazuje da imaju izuzetno važne uloge u CNS-u. Astrociti se u CNS-u nalaze u desetostruko većem broju od neurona, poseduju citoarhitekturna i fenotipska svojstva koja im omogućavaju da detektuju i na adekvatan način odgovore na promene koje se dešavaju u njihovom mikrokruženju. Iz tog razloga imaju brojne funkcije u moždanom tkivu (Xiao i Le, 2016).

Astrociti posredstvom svojih nastavaka formiraju visokoorganizovanu funkcionalnu mrežu, između sebe povezanu brojnim pukotinastim vezama (eng. *gap junction*). Specijalno građeni stopalasti završeci ovih nastavaka učestvuju u izgradnji KMB-e i na taj način regulišu transport molekula između krvi i moždanog parenhima. Takođe astrociti sintetišu i oslobađaju različite medijatore kao što su prostaglandini (PGE) i azotni monoksid (NO) koji promenom tonusa krvnih sudova povećavaju ili smanjuju protok krvi u moždanom

parenhimu. Na ovim nastavcima su takođe eksprimirani brojni receptori za neurotransmitere (Glu, GABA, glicin, histamin), citokine i faktore rasta, kao i različiti transporter i jonski kanali. Transporteri učestvuju u brzom uklanjanju neurotransmitera iz sinaptičke pukotine, što je osnovni proces kojim se okončava sinaptička transmisija, onemogućava difuzija transmitera u okolinu sinapse i održava normalna nervna ekscitabilnost. Osim indirektnog uticaja na sinaptičku transmisiju uklanjanjem transmitera oslobođenih od strane neurona, astrociti takođe direktno utiču na ekscitabilnost neurona oslobađanjem molekula koji se nazivaju gliotransmiteri (Glu, purini, GABA) (Rose i sar., 2004).

Pored kratkoročnog uticaja na sinaptičku aktivnost, astrociti ispoljavaju dugoročne efekte na sinapse oslobađanjem neurotrofičnih faktora (NTF), koji imaju brojne funkcije tokom razvoja nervnog sistema, ali i nakon perioda maturacije (Rose i sar., 2004).

Tokom procesa širenja akcionog potencijala oslobađa se velika količina K^+ u ekstracelularni prostor, koji astrociti zahvaljujući velikoj permeabilnosti za K^+ i aktivnosti Na^+/K^+ ATPaze preuzimaju i posredstvom pukotinastih veza prenose u područje njegove niže koncentracije i na taj način održavaju ekstracelularnu koncentraciju K^+ u fiziološkim granicama (Allaman i sar., 2011).

Astrociti ispoljavaju neuroprotektivni potencijal zahvaljujući tome što poseduju znatno veću koncentraciju molekula i enzima koji učestvuju u antioksidativnoj zaštiti. Takođe imaju visoku ekspresiju metalotionina (MT) i ceruloplazmina, molekula koji vezuju metale, učesnike u redoks oštećenju molekula. Obzirom na visoki metabolički obrt i energetske potrebe u neuronima, kao i osetljivost na mala kolebanja pH vrednosti u njihovom okruženju, izuzetno su važne funkcije regulisanja pH vrednosti i snabdevanja neurona energetskim konstituentima (laktat) od strane astrocita (Allaman i sar., 2011).

U stanjima nakon oštećenja CNS-a astrociti ispoljavaju funkciju fagocita, stimulišući procese reparacije i na taj način stvarajući glijalni ožiljak (astroglia) (Razavi i sar., 2015; Rose i sar., 2004).

3.1. Neurotrofični faktor moždanog porekla

Faktori rasta su grupa proteinskih molekula koji regulišu procese ćelijskog rasta, diferencijacije i sazrevanja. Za normalan razvoj CNS-a, preživljavanje i obnavljanje neurona najznačajnije su tri NTF: familija nervnog faktora rasta (eng. *nerve growth factor family*, ili

neurotrofini), familija NTF porekla glijalnih ćelija (eng. *glial cell line-derived neurotrophic factor family*, *GDNF*) i heterogena grupa molekula koja pripada familiji citokina. Svi NTF ispoljavaju svoje biološko dejstvo aktivacijom specifične familije tropomiozin kinaznih receptora (*Trk*) i p75 receptora koji pripada superfamiliji receptora faktora tumorske nekroze (*TNFr*) (Razavi i sar., 2015; Xiao, 2016).

Predstavnik familije nervnog faktora rasta je neurotrofični faktor moždanog porekla (eng. *brain derived neurotrophic factor*, *BDNF*) koji utiče na preživljavanje neurona različitih delova CNS-a posredujući u nastanku strukturnih promena koje su odraz neuronske aktivnosti (Huang i Reichardt, 2001). Takođe učestvuje i u procesima regulacije kortikalne ekscitabilnosti utičući na otvaranje natrijumskih kanala i indukovanje akcionog potencijala (Rose i sar., 2004). *BDNF* ispoljava brojne efekte aktivirajući *TrkB* receptore na mestu stvaranja i u susednim neuronima, pokreće *PI3K-Akt* kinazni put kojim se ushodno reguliše sinteza ključnih proteina koji učestvuju u procesima sinaptičke plastičnosti i neurogeneze, što zajedno rezultira neuroprotekcijom (Mattson, 2008; Rothman i Mattson, 2013), dok smanjenje nivoa signalizacije putem *TrkB* receptora značajno smanjuje nivo zaštite neurona od oštećenja (Ma i sar., 2013). U studijama na kulturama hipokampalnih piramidalnih neurona je pokazano da *BDNF* utiče na povećanje gustine dentritskih spina i indukciju *LTP* (Cheung i Ip, 2007; Lazo i sar., 2013). U svim ovim procesima zapažena je uloga glutamata. Oslobođanje *BDNF* zahteva aktivaciju glutamatnih *NMDA* receptora signalnim putem Ca^{2+} /kalmodulin-zavisnih kinaza, koje potom u aktivnim dendritima stimulišu translaciju informacione ribonukleinske kiseline (iRNK) za *BDNF*, aktivaciju *CREB* (eng. *cAMP response element-binding protein*) koji dodatno indukuje ekspresiju gena za *BDNF* (Lazarov i sar., 2010). Tako se ekspresija i sekrecija *BDNF* povećavaju u odgovoru na sinaptičku aktivnost, a sa druge strane povećana sekrecija *BDNF* pojačava *LTP* tj. omogućava konsolidaciju dugotrajnih promena na sinapsi i promenu lokalne sinaptičke efikasnosti (Bramham, 2008; Harward i sar., 2016). Efekat fizičke aktivnosti ispoljava se kroz povećanje koncentracije *BDNF*, koji obezbeđuje efikasnije procese neurotransmisije, poboljšava kognitivne procese i stimuliše adultnu neurogenezu (Liu i Nusslock, 2018; Marlatt i sar., 2012). Na životinjama je potvrđena supresija oksidativnog oštećenja, kao i uticaj interakcije *BDNF* i komponenti antioksidativne zaštite na stepen kognitivnih funkcija (Fahnestock i sar., 2012; Hacıoglu i sar., 2016).

3.2. Glijalni fibrilarni kiseli protein

Glijalni fibrilarni kiseli protein (eng. *glial fibrillary acidic protein; GFAP*) je glavni intermedijalni filament klase III u zrelih astrocitima. Ovaj molekul se osim u astrocitima eksprimira i u ćelijama bubrega, pankreasa, jetre, kostiju, limfocitima, kao i u ependimskim ćelijama (Cheung i Ip, 2007).

Do sada je izolovano deset izoformi *GFAP*-a (Rothman i Mattson, 2013). Izoforma *GFAP δ* (delta) se eksprimira u posebnim tipovima astrocita (subpialni), kao i u adultnim matičnim ćelijama neurona. U citosolu astrocita *GFAP* formira mrežu, koja se stalno rearanžira indukcijom procesa fosforilacije/defosforilacije i na taj način ćeliji obezbeđuje oblik, pravilno pozicioniranje, pokretljivost i proliferaciju. Ekspresija *GFAP δ* je povećana u nekim vrstama glijalnih tumora, epilepsiji i predstavlja jednu od karakteristika reaktivne astroglioze, koja nastaje nakon povrede mozga, zapaljenja, vaskularnih oboljenja ili neurodegenerativnih bolesti (Cheung i Ip, 2007; Rothman i Mattson, 2013). Snižena ekspresija ovog molekula je uočena u nekim duševnim poremećajima i poremećajima ponašanja (Mattson, 2008).

Mutacija gena za *GFAP* dovodi do pojave letalne neurodegenerativne bolesti, fibrinoidne leukodistrofije (Aleksanderove bolesti), koju odlikuje niz razvojnih poremećaja, koji su posledica reaktivne astroglioze (Rothman i Mattson, 2013). Uprkos postojanju različitih izoformi ovog molekula, njegova kvantifikacija predstavlja pouzdan metod u detekciji promena koje se dešavaju u astrocitima.

Zajednička odlika različitih oboljenja i patoloških stanja CNS je veoma izraženo aktiviranje glija ćelija, uključujući astrocite i mikrogliju, čija reaktivacija dovodi do oštećenja i odumiranja nervnih ćelija zahvaćenih neurodegenerativnim procesom, promovisanjem oksidativnog stresa i ekscitotoksičnosti.

I 4. Medijatori ćelijske smrti

4.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali (SR) su joni, atomi ili molekuli, sa jednim ili više nesparenih elektrona u poslednjoj orbitali, što im omogućava da reaguju međusobno ili sa neradikalnim reaktivnim vrstama i na taj način dovedu do lančanih reakcija koje imaju osobinu prostornog i vremenskog širenja. Stvaranje slobodnih radikala dešava se kontinuirano u toku brojnih

fizioloških procesa u ćelijama tokom enzimskih reakcija koje katalizuju oksidaze, u oksidoredukcionim procesima u prisustvu metala promenljive valence, procesima oksidativne fosforilacije u mitohondrijama i tokom autooksidacije malih molekula, proces apoptoze, sinteza eikosanoida, u toku biotransformacije ksenobiotika u endoplazmatskom retikulumu, pri pojačanoj fizičkoj aktivnosti, apoptozi, inflamaciji i u bolestima, u toku biotransformacije, apsorpcije zračenja, pri trovanjima (Eiserich i sar., 1998; Halliwell i Gutteridge, 1985).

4.2. Reaktivne vrste

Reaktivne vrste (RV) obuhvataju SR i druge klase jedinjenja koje su visoko reaktivne i predstavljaju oksidacione agense koji učestvuju u oštećenju biomolekula tj. nastanku oksidativnog (OS) i nitrozativnog stresa. Prema aktivnom hemijskom elementu dele se na RV sa kiseonikom (RVK), azotom (RVA), ugljenikom (RVU) i sumporom (RVS) (Đukić, 2008).

Oksidativni procesi u aerobnim organizmima omogućeni su prisustvom molekulskog kiseonika (O_2), koji je u tom obliku slabo reaktivan. Međutim, transferom elektrona ili energije na O_2 , moguće je povećanje njegove reaktivnosti. Na taj način nastaju RVK u koje se ubrajaju SR kiseonika i neradikalske vrste. Primer RVK koji nastaje dovođenjem energije na O_2 je singlet kiseonik (1O_2) koji nije po definiciji radikal (nema nesparene elektrone), već neradikalska forma koja poseduje viši oksidacioni potencijal i mogućnost da direktno prenese energiju na biomolekule i da ih oksiduje (Scandalios, 2005).

Proces ćelijskog disanja ili oksidativna fosforilacija koja se odvija u respiratornom lancu mitohondrija predstavlja najznačajniji izvor RVK. Tokom procesa respiracije, O_2 se kompletno redukuje do vode dodavanjem četiri elektrona, što se odigrava lančano uz formiranje redukovanih intermedijera. U organizmu sisara više od 95 % od unetog O_2 dospeva u respiratorni lanac gde se odvija kompletna četvoroelektronska redukciju do H_2O , dok parcijalnoj redukciji podleže oko 1-5 % O_2 i transformiše se u RVK. Jednoelektronskom redukcijom O_2 nastaje superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), dvoelektronskom vodonik peroksid (H_2O_2), a troelektronskom hidroksil radikal ($\cdot OH$) (Đukić, 2008; Scandalios, 2005).

Glavno mesto sinteze $O_2^{\cdot-}$ u ćeliji su kompleks I (NADH dehidrogenaza) i kompleks III (citohrom *c* reduktaza) respiratornog lanca mitohondrija. Kompleks I je multiproteinski kompleks integrisan u unutrašnju membranu mitohondrija koji oksiduje NADH koristeći koenzim Q kao akceptor elektrona, dok kompleks III oksiduje koenzim Q, a kao akceptor elektrona koristi citohrom *c*. Obe reakcije dovode do stvaranja transmembranskog potencijala

neophodnog za sintezu ATP, ali i do nastanka $O_2^{\cdot-}$. Dejstvom kompleksa I, stvoreni $O_2^{\cdot-}$ dospeva samo u mitohondrijalni matriks, dok $O_2^{\cdot-}$ koji stvara kompleks III dospeva i u matriks i u citosol (Andreyev i sar., 2005). Jednoelektronska redukcija O_2 u baznim uslovima sredine prvenstveno dovodi do nastanka dva hidroperoksil radikala (HO_2^{\cdot}), dok se $O_2^{\cdot-}$ dominantno sintetiše pri nižim pH vrednostima (Scandalios, 2005). Kao RVK, $O_2^{\cdot-}$ je slabo reaktivan, ali poseduje potencijal da reaguje sa drugim molekulima i stvara sekundarne reaktivne vrste, pa tako u reakciji između $O_2^{\cdot-}$ i azot monoksida ($\cdot NO$) nastaje izrazito reaktivni peroksinitrit ($ONOO^-$).

Autooksidacijom $O_2^{\cdot-}$ nastaje H_2O_2 , stabilna neradikalska vrsta, koji je umereno reaktivan. U ćelijama ova reakcija se odvija enzimskim i neenzimskim putem. Slaba reaktivnost H_2O_2 je uvećana usled lakog difundovanja kroz ćelijske membrane, što doprinosi prostornoj progresiji OS, kao i time što predstavlja polazni molekul u reakciji stvaranja visoko reaktivnog $\cdot OH$. Ova reakcija u kojoj H_2O_2 reaguje sa jonima metala sa prelaznom valencom naziva se Fentonova reakcija. Na taj način formirani kratkoživeći OH^{\cdot} (poluživot oko 10 sekundi) reaguje blizu mesta neselektivno sa gotovo svim molekulima, uzrokujući značajna oštećenja ćelija (Đukić, 2008).

Oksidativni stres nastaje kao posledica metaboličkih procesa u kojima se troši kiseonik i predstavlja narušenu ravnotežu između prooksidativnih i antioksidativnih reakcija. Reaktivne vrste mogu da reaguju sa proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama i tako dovedu do oštećenja ovih molekula i inhibicije njihove funkcije. Okidači oksidativnog stresa mogu biti nasledni ili indukovani genski defekti, faktori životne sredine, kao i metaboličke fluktuacije (Apel i Hirt, 2004).

4.3. Uloge RV u fiziološkim uslovima organizma

Istorijski posmatrano za RV se smatralo da ispoljavaju isključivo štetne efekte na organizam, međutim, novija istraživanja ukazuju da niske i umerene koncentracije ovih molekula predstavljaju važne fiziološke regulatore unutarćelijske signalne transdukcije. Najpoznatiji primer uticaja RV na signalnu modulaciju je kovalentna modifikacija tj. oksidacija specifičnih cisteinskih rezidua koja izaziva reverzibilnu promenu aktivnosti ciljnih enzima. Takođe, na dejstvo brojnih faktori rasta, hormona i faktora koagulacije RV utiču kao sekundarni glasnici koji potom mogu izazivati ligi nezavisne modulacije signalnih kaskada (Finkel, 2011; L. B. Drobot i A. V. Bazalii, 2013), menja se i ekspresija gena, a pretpostavlja

se da se ovaj efekat postiže oksidacijom ciljnih molekula u signalnom putu i smanjenjem njihove funkcije ili pak uticajem na aktivnost transkripcionih faktora (Apel i Hirt, 2004). Ne treba zaboraviti uticaj RV na sazrevanje spermatozoida, a tokom razvoja embriona i fetusa aktivaciju faktora transkripcije, koji menjaju gensku ekspresiju tokom razvića (Buonocore i sar., 2010).

4.4. Sistemi zaštite od oksidativnih oštećenja

Obzirom da bilo koja ćelijska struktura može biti meta oštećenja dejstvom RV, ćelije poseduju različite sisteme antioksidativne zaštite (AOZ). Sistem AOZ čini velika mreža proteina, signalnih molekula i drugih jedinjenja koji imaju za cilj da preveniraju produkciju ili uklanjaju stvorene RV, kao i da repariraju oštećenja nastala usled povećane akumulacije RV.

U uslovima povećanog stvaranja RV aktivni su sistemi koji se prema prirodi i načinu delovanja mogu podeliti na enzimske ili primarne (katalaza, CAT; glutation-peroksidaza, GPx; glutation reduktaza, GR; glutation-S-transferaza, GST; superoksid-dizmutaza, SOD) i neenzimske ili sekundarne (vitamini E i C, tiol jedinjenja–glutation, cistein, zatim koenzim Q, flavonoidi i druga fenolna jedinjenja).

Druga grupa enzima ili enzimski antioksidanti učestvuju u reparaciji već nastalog oksidativnog oštećenja biomolekula, u slučajevima kada primarna AOZ nije bila dovoljna da prekine stvaranje RV i propagaciju OS i ne utiču direktno na same RV (Đukić, 2008; Finkel i Holbrook, 2000)

4.4.1. Neenzimska antioksidativna zaštita

U neenzimske komponente antioksidativne zaštite ubrajaju se različiti hidrosolubilni i liposolubilni molekuli. Najviše proučavane hidrosolubilne komponente su glutation, L-askorbinska kiselina (vitamin C), mokraćna kiselina, albumin, transferin, bilirubin, poliamini, a liposolubilne retinol (vitamin A), β -karoten (provitamin A), α -tokoferol (vitamin E) i ubihinon (koenzim Q) (Mironczuk-Chodakowska i sar., 2018).

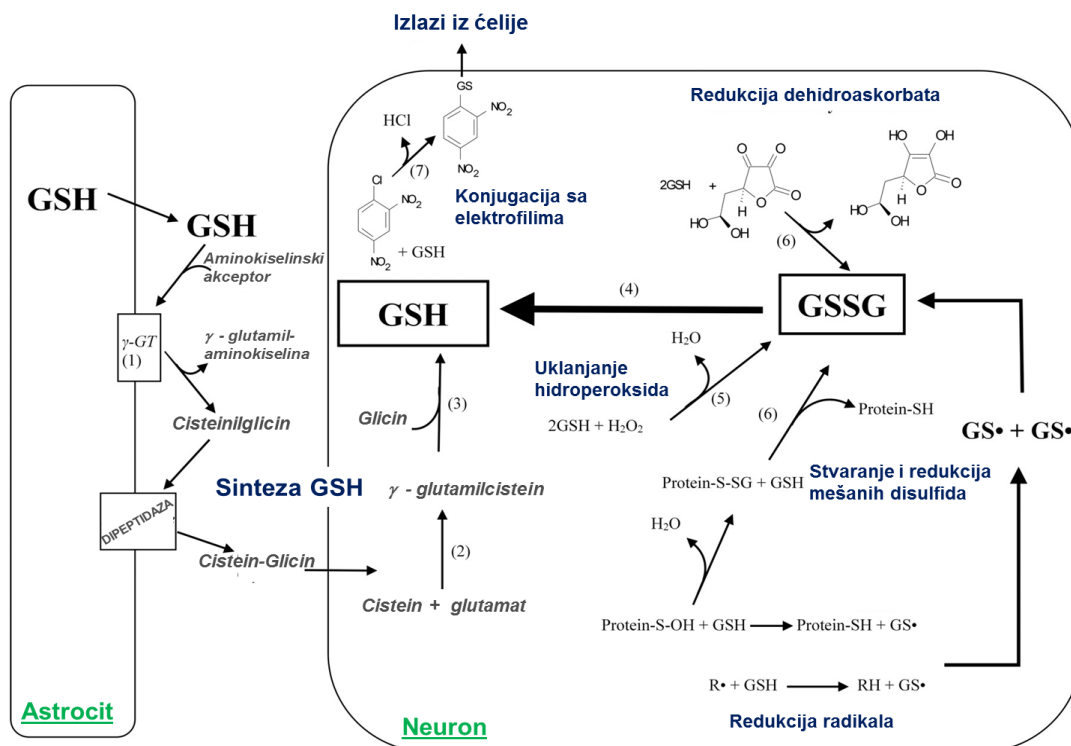
Značajno mesto u sistemu neenzimske zaštite pripada i MT. Oni su proteini male molekulske mase koji vezuju metale unutar ćelije, tako da su im osnovne uloge deponovanje i transport esencijalnih, ali i toksičnih metala (Juarez-Rebollar i sar., 2017). Osim primarne funkcije, oni učestvuju u regeneraciji tkiva i regulaciji genske ekspresije, što doprinosi zaštiti

od toksičnih efekata ksenobiotika (Cherian i Kang, 2006). U molekulu MT, cistein-tiolatne grupe vezuju se sa jonima metala i grade metal-tiolatne grupe koje reaguju sa $O_2^{\cdot-}$ i OH^{\cdot} . Imaju izražen afinitet uklanjanja OH^{\cdot} i $O_2^{\cdot-}$ radikala, ali i RVA koji se vezuju za cistein-tiolatne grupe MT i daju S-nitrozo-tiole (Misra i sar., 1996).

4.4.1.1. Glutation

Tripeptid glutation (L- γ -glutamil-L-cistenil-glicin) je niskomolekulsko tiolno jedinjenje, koje čini 90% ukupnih neproteinskih sulfhidrilnih jedinjenja ćelije. U većini ćelija nalazi se u milimolarnoj koncentraciji. U citosolu je prisutan u koncentraciji od 1-11 mM, u jedru 3-15 mM, a u mitohondrijama od oko 5-11 mM. Ekstracelularni nivo glutaciona je nizak i njegova koncentracija iznosi nekoliko μ M (Lu, 2013).

U γ -glutamilskom ciklusu, glutation se sintetiše iz glutamata, cisteina i glicina uzastopnim delovanjem γ -glutamilcistein-sintetaze (γ -GCS) i glutation sintetaze (GS) (slika I 3.). Za ove reakcije potrebna su dva molekula ATP. Njihovom hidrolizom obezbeđuje se potrebna energija pri čemu se karboksilna grupa aktivira za sintezu peptidne veze stvaranjem acil-fosfatnog intermedijera. Degradacija glutaciona do amino kiselina iz kojih se sastoji, odigrava se katalitičkim dejstvom više enzima: γ -glutamil transpeptidaze, γ -glutamil ciklotransferaze, 5-oksoprolinaze i intracelularne proteaze. Glutation omogućava transport amino kiselina u γ -glutamilskom ciklusu kroz ćelijsku membranu. Glutation se najpre transportuje na spoljašnju stranu membrane gde se amino kiselina koja se unosi u ćeliju vezuje za glutation i nastaje γ -glutamil-aminokiselinski-dipeptid (Anderson i Meister, 1983). U ovoj reakciji stvara se peptidna veza između α -amino-grupe i γ -glutamil ostatka glutaminskog dela glutaciona. Ovu reakciju katalizuje enzim γ -glutamil-transpeptidaza. Kompleks γ -glutamil-amino-kiselina prolazi kroz membranu i ulazi u citosol ćelije. Za ovaj proces neophodni su enzimi koji oslobađaju aminokiselinu iz ovog kompleksa i resintetišu glutation održavajući potreban nivo njegove koncentracije u ćeliji. Iz γ -glutamil-aminokiselinskog kompleksa oslobađa se transportovana amino kiselina i 5-oksoprolin kao intermedijer. Poslednji stepen predstavlja hidroliza 5-oksoprolina, koja se vrši u prisustvu ATP dejstvom 5-oksoprolinaze (Trayhurn i van Heyningen, 1973).



Slika I 3. Sinteza, matabolizam i funkcije glutaciona u CNS-u

Redukovani glutation (GSH); Oksidovani glutation (GSSG), γ -glutamyl-transferaza (γ -GT); hlorovodonična kiselina (HCl), voda (H_2O), vodonik peroksid (H_2O_2)

U organizmu se nalazi u dve forme, redukovanoj tiolnoj GSH formi i oksidovanoj disulfidnoj GSSG formi (Parris M, 1997). Pri normalnim fiziološkim uslovima, više od 98% intracelularnog glutaciona je u redukovanom stanju, dok je ostatak prisutan u vidu disulfidne forme GSSG, mešanih disulfida (uglavnom GSS-protein) i tioestara (Wang i Ballatori, 1998). Oksidovani glutation u normalnim okolnostima čini manje od 1 % ukupnog glutaciona, dok u stanju oksidativnog stresa dolazi do povećanja koncentracije GSSG (Brigelius-Flohe, 1999). Enzim GR konvertuje GSSG u GSH uz prisustvo redukovanog NADPH koji se stvara aktivnošću enzima glukozo-6-fosfat dehidrogenaza (G6PDH) u glukozomonofosfatnom ciklusu (Halliwell, 1996).

Pored aktivnosti enzima GR i enzima uključenih u njegovu sintezu, koncentracija glutaciona u ćeliji regulisana je i *de novo* sintezom, koja se odigrava u citosolu svih ćelija. *De novo* sinteza glutaciona regulisana je nivoom γ -GCS koja je prisutna u ćeliji, dostupnošću supstrata i povratnom spregom glutaciona na γ -GCS. Intracelularni nivoi amino-kiselina variraju s obzirom na vrstu organizma i tkivo, ali nivo L-cisteina je konstantno niži u odnosu

na nivoe L-glutamata i glicina, tako da je dostupnost L-cisteina osnovni ograničavajući faktor za sintezu glutaciona (Griffith, 1999). Sinteza glutaciona zahteva ATP, tako da i ovaj supstrat može da bude još jedan faktor ograničenja. Nedostatak glukoze povezan je sa niskim nivoom glutaciona, jer ATP može ograničiti sintezu glutaciona kada je narušen energetski metabolizam ćelije (Papadopoulos i sar., 1997). Koncentracija glutaciona je takođe regulisana intenzitetom trošenja u procesima detoksikacije u ćeliji, kao i preraspodelom glutaciona između organa (Bannai i sar., 1991).

Iako se sintetiše u ćeliji, njegova biodegradacija odigrava se izvan ćelije. Između glutamata i cisteina, glutation gradi specifičnu γ -karboksilnu peptidnu vezu, koju može da raskine samo γ -glutamyltranspeptidaza (γ -GTP), koja se nalazi na spoljašnjoj površini membrane određenih tipova ćelija. Vezu između cisteina i glicina raskidaju dipeptidaze, koje se takođe nalaze na spoljašnjoj površini ćelijskih membrana. Produkti razgradnje, amino-kiseline glutamat, glicin i cistein, mogu da se reapsorbuju u ćeliju za ponovnu sintezu glutaciona. Glutamat i glicin se reapsorbuju u ćeliju, a cistein S-konjugati se intracelularno metabolišu, a zatim se ekskretuju iz organizma ili podležu daljem metabolizmu (Wang i Ballatori, 1998).

Glutacion učestvuje u brojnim metaboličkim aktivnostima ćelije, uključujući AOZ, detoksikaciju različitih ksenobiotika, održavanje proteinske strukture i funkcije, regulaciju sinteze i degradacije proteina, metabolizam leukotriena i prostaglina, redukciju ribonukleotida do dezoksiribonukleotida, regulaciju ćelijskog ciklusa i gensku ekspresiju (Dickinson i Forman, 2002).

Najvažniju ulogu glutacion, kao tiolni antioksidant u ćeliji, ostvaruje uklanjanjem RVK kroz enzimsku reakciju, glutacion zavisnom redukcijom H_2O_2 i drugih hidroperoksida uz GPx i detoksikacijom ksenobiotika i elektrofila uz glutacion-S-transferazu (Parke i Sapota, 1996). Pored toga što je kofaktor antioksidativnih enzima, glutacion direktno uklanja slobodne radikalske vrste $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} i $ONOO^{\cdot-}$, kao i lipidne radikale i hidroperokside. On regeneriše važne neenzimske antioksidante (askorbinsku kiselinu, α -tokoferol) do njihovih aktivnih formi, uključuje se u direktnu popravku oksidativnih oštećenja molekula DNK i sprečava apoptozu izazvanu RVK i citokinima (Kruidenier i Verspaget, 2002). Takođe, neenzimskim reakcijama, zahvaljujući sposobnosti da reaguje sa organskim radikalima (R^{\cdot}) sintetiše se $O_2^{\cdot-}$ koji se dalje redukuje aktivnošću SOD i sprečava oksidativna oštećenja.

Glutation je jedan od značajnih liganada koji vezuju metale, tako da ima važnu ulogu u njihovom transportu, deponovanju i metabolizmu. Još jedna od uloga glutaciona je skladištenje i transport cisteina, koji se u slobodnom obliku brzo autooksiduje u cistin, čime se podstiče stvaranje toksičnih radikala kiseonika. Da bi se sprečila toksičnost reakcije, većina neproteinskog cisteina se nalazi u formi glutaciona (Wang i Ballatori, 1998).

4.4.1.2. Sulfhidrilne (SH) grupe

Svako organsko jedinjenje koje sadrži SH grupu vezanu za ugljenik naziva se tiol (R-SH). Funkcionalna SH grupa amino-kiseline cistein ima najvažniju ulogu u živim sistemima. Osim glutaciona veliki broj proteina sadrži cistein koji zbog postojanja SH grupe može da bude modifikovan kroz različite redoks reakcije (Di Simplicio i sar., 2003).

Promena konformacije proteina može da utiče na promene aktivnosti enzima i transportera, vezivanje liganada za receptore, a može dovesti i do međuproteinske interakcije, protein-DNK interakcije ili degradacije proteina (Sun i sar., 2012).

Redoks modifikacija SH grupa proteina obuhvata različite reakcije, kao što su nitrozilacija, hidroksilacija, glutationilacija i formiranje proteinskih disulfida (S-S). Nitrozilacija SH grupa igra važnu ulogu u procesu prenosa signala sa površine ćelije u intracelularne kompartmente, kao što su jedro i mitohondrije. Hidroksilacija proteina može da dovede do dalje oksidacije u štetne sulfinske i sulfonske kiseline (Kalinina i sar., 2010).

Mnogi proteini su aktivni kada su SH grupe koje su ključne za njihovo funkcionisanje u redukovanoj, tiolnoj formi, dok je za druge potrebno da budu u oksidovanoj, disulfidnoj formi. Tiol-disulfidne promene su bidirekzione, tako da je njihova ravnoteža određena ćelijskim redoks statusom (Schafer i Buettner, 2001).

Oksidovani glutacion reaguje sa proteinima pri čemu nastaju protein-GSH mešani disulfidi (glutationilovani proteini), dok u slučaju reakcije sa dve SH grupe proteina nastaju disulfidni mostovi (Dickinson i Forman, 2002). Važan enzim koji vrši glutationilaciju je GST. U uslovima oksidativnog stresa nivo protein-GSH mešanih disulfida se povećava i tada je smisao glutationilacije zaštita cisteinskih rezidua od dalje oksidacije proteina. Glutationilacija može da utiče i na enzimsku aktivnost, što ukazuje na dodatnu regulatornu ulogu ovog procesa (Kalinina i sar., 2014).

Značajni enzimi u oksidoreduktivnoj regulaciji SH grupa su tioredoksin, glutaredoksin i protein disulfid izomeraza. Tiorredoksin i glutaredoksin su disulfid reduktaze koje katalizuju redukciju disulfidnih mostova ciljnih proteina, pri čemu glutaredoksin može da katalizuje i redukciju protein-GSH mešanih disulfida (deglutinationilacija proteina) (Pirazzini i sar., 2014). Disulfidni tioredoksin vraća se u aktivnu formu preko NADPH zavisnog enzima tioredoksin reduktaze, a glutaredoksin se redukuje drugim molekulom glutaciona (Janssen-Heininger i sar., 2008). Dok tioredoksin i glutaredoksin redukuju SH grupe, protein disulfid izomeraza uglavnom stvara disulfidne mostove u proteinu (Netto i sar., 2007)

U odgovoru ćelije na OS menja se koncentracija slobodnih SH grupa, tako da ovaj parametar određuje nivo oksidacije proteina i drugih tiola u ćeliji i predstavlja dobar biomarker OS .

4.4.2. Enzimska antioksidativna zaštita

Enzimske komponente primarne AOZ čine SOD, GR, GPx i GST (van der Oost i sar., 2003).

4.4.2.1 Superoksid-dizmutaza

Superoksid-dizmutaza (SOD) predstavlja prvu liniju odbrane od RVK i ima ključnu ulogu u zaštiti ćelije od oksidativnih oštećenja. To je metaloproteinski enzim koji prevodi visoko reaktivni radikal $O_2^{\cdot-}$ u manje reaktivan H_2O_2 i molekularni O_2 . Tokom evolucije nastalo je više klasa enzima SOD, i na osnovu metala u aktivnom centru enzima i lokacije u ćeliji, opisane su tri izoforme SOD kod sisara:

- Superoksid-dizmutaza koja sadrži bakar cink (Cu, Zn SOD) je prva identifikovana izoforma SOD. Nalazi se u citosolu eukariotskih ćelija, a kod sisara i u jedru, endoplazmatskom retikulumu, peroksizomima, mitohondrijama i lizozomima. Homodimer je i ima molekulska masu od 32 kDa, svaka subjedinica enzima sadrži po jedan atom redoks aktivnog metala Cu^{2+}/Cu^+ i jedan atom Zn^{2+} koji ima strukturnu ulogu (Fukai i Ushio-Fukai, 2011). Gen za Cu, Zn SOD se nalazi u humanojoj populaciji na hromozomu 21 i hromozomu 16 kod miša (Zelko i sar., 2002).

- Superoksid-dizmutaza koja sadrži mangan (Mn SOD) prisutna je kod prokariota i u mitohondrijama i peroksizomima eukariota, homotetramer je molekulske mase 96 kDa, sa

jednim atomom Mn^{3+}/Mn^{2+} po subjedinici (Fukai i Ushio-Fukai, 2011). Gen za ovu formu se nalazi na hromozomu 6 kod čoveka i 17 kod miša (Zelko i sar., 2002).

- Ekstracelularna superoksid-dizmutaza (EC SOD) je poslednja otkrivena i najmanje proučena forma enzima SOD koja u aktivnom centru ima Cu i Zn. Pronađena je isključivo kod sisara i ima jedinstvenu strukturu. Kod većine vrsta predstavlja homotetramer sačinjen od dva dimera povezana disulfidnim vezama molekulske mase 135 kDa (Fukai i Ushio-Fukai, 2011). Prevažadno se nalazi u intersticijalnom matriksu tkiva gde je vezana za heparan sulfat proteoglikane na površini ćelija, a u manjoj količini pronađena je u ekstracelularnim tečnostima (plazma, limfa, sinovijalna i cerebrospinalna tečnost). Gen za SOD je lokalizovan na hromozomu 4 kod čoveka, a kod miša se nalazi na hromozomu 5 (Zelko i sar., 2002).

Uloge SOD u organizmu su značajne, jer menjajući koncentraciju $O_2^{\cdot-}$ kao i krajnjeg produkta katalitičke reakcije H_2O_2 , u organizmu indirektno moduliraju vaskularni tonus, gensku ekspresiju, međućelijsku signalizaciju, ćelijski rast, kao i inflamatorni odgovor i apoptozu (Fukai i Ushio-Fukai, 2011).

4.4.2.2. Glutation-reduktaza

Glutation reduktaza (GR) je prisutna u prokariotskim ćelijama i u citosolu i mitohondrijama eukariotskih ćelija. Ovaj enzim katalizuje reakciju redukcije oksidovanog glutationa (GSSG) u redukovani glutation (GSH), pri čemu se kao redukujući ekvivalent koristi NADPH (Couto i sar., 2016)

Enzim GR je homodimerni flavoprotein koji u aktivnom centru ima disulfid. Svaka subjedinica sadrži prostetičku grupu flavin adenin dinukleotid (FAD). Katalitički ciklus GR ima dve faze, prvo NADPH redukuje FAD, pri čemu se redukujući ekvivalent prenosi na redoks aktivan disulfid, a zatim dolazi do redukcije GSSG u aktivnom centru enzima (Ulus i Tandogan, 2007). Održavanjem pula glutationa uglavnom u redukovanom stanju, GR ostvaruje značajnu ulogu u regulaciji redoks homeostaze u ćeliji (Couto i sar., 2016).

4.4.2.3. Glutation S-transferaza

Glutation S-transferaza (GST) pripada familiji enzima II faze detoksikacije ksenobiotika. Do sada je u citosolu sisara izolovano sedam klasa GST, koje su formirane na osnovu sličnosti u redosledu amino kiselina u lancu enzima i označene su slovima grčkog alfabeta: alfa (α), mi (μ), pi (π), sigma (σ), teta (θ), omega (ω) i zeta (ξ), a ovih sedam klasa

daje sedamnaest izoformi. Najvažnija uloga GST je konjugacija GSH sa širokim spektrom drugih supstrata, uključujući sekundarne produkte lipidne peroksidacije (Dasari i sar., 2018).

U mozgu pacova su izolovane tri izoforme α , μ i π , koje su eksprimirane u odgovoru na prisustvo toksičnih hemikalija. Izoforma GSTA4 je izolovana u komponentama KMB i smatra se da je tako pozicionirana radi zaštite mikrosredine ćelija CNS-a (Abbott i sar., 2006).

4.5. Biološki efekti slobodnih radikala

4.5.1. Lipidna peroksidacija

Najizraženiji negativni efekat delovanja SR je oksidacija višestruko nezasićenih masnih kiselina ćelijskih membrana, poznata kao lipidna peroksidacija (LPO) tokom koje dolazi do njihovog oštećenja (Ayala i sar., 2014).

Polinezasićene masne kiseline fosfolipidnog dvosloja ćelijskih membrana predstavljaju glavne ciljne molekule oksidativnog oštećenja. Najreaktivniji SR kiseonika, OH^\bullet , započinje proces LPO preuzimanjem vodonikovog atoma nezasićene masne kiseline lipida (LH), što dovodi do nastanka lipidnog radikala (L^\bullet). On u reakciji sa O_2 prelazi u reaktivan lipidni peroksil radikal (LOO^\bullet), koji zatim preuzima vodonikov atom sa susednog lipida i formira lipidni hidroperoksid (LOOH). Novonastali L^\bullet radikal reaguje sa susednim lipidom u lančanoj reakciji koja dovodi do akumulacije lipidnih hidroperoksida. Lipidni hidroperoksid u reakciji sa redukovanim metalima (Fe^{2+}) dovodi do nastanka lipidnog alkoksil radikala (LO^\bullet). On može da reaguje sa drugim lipidom, pri čemu se formiraju L^\bullet i lipidni aldehid (LOH). Takođe, LOOH može da interaguje sa oksidovanim metalima (Fe^{3+}) formirajući LOO^\bullet (Catala, 2006; Fagali i Catala, 2009).

Lipidni hidroperoksidi su nestabilni, razlažu se i formiraju veoma reaktivna aldehidna jedinjenja, koja su znatno stabilnija od RVK i lako difunduju u ćelije. Najpoznatiji toksični aldehidni produkti LPO su 4-hidroksi-2-noneal (HNE) i malondialdehid (MDA), koji se koristi kao biomarker stepena oksidativnog oštećenja ćelijskih membrana (Spickett i sar., 2010).

Akumulacija hidroperoksida u membranama dovodi do promene njihove fluidnosti i tako utiče na aktivnost transmembranskih enzima, transportera, receptora i drugih membranskih proteina. Krajnji rezultat LPO je promena propustljivosti membrane, što dovodi

do narušavanja ćelijskog metabolizma, poremećaja homeostaze, odnosno do ćelijske smrti (Kruidenier i Verspaget, 2002).

4.5.2. Mehanizam ekscitotoksičnosti

U fiziološkim uslovima optimalna koncentracija Glu u ekstracelularnom prostoru se održava adekvatnom funkcijom *EAAT*. Brzo i povećano oslobađanje Glu iz presinaptičkih terminala koje se dešava u patološkim uslovima, prevazilazi kapacitet transportera za njegovim preuzimanjem i okončanjem ekscitatorne neurotransmisije, kada se ispoljava njegovo citotoksično dejstvo. Ekscitotoksičnost je patološki proces nastao usled prekomerne i produžene stimulacije receptora ekscitatornih amino-kiselina, pre svega Glu koji za posledicu ima neuronsko oštećenje ili smrt (Atlante i sar., 2001).

Iako su osnovni mehanizmi ćelijskog oštećenja u neurotoksičnosti poznati, brojna istraživanja i u sadašnjem vremenu dopunjuju ova saznanja, konkretno izvori i uloga RVK i antioksidativne zaštite.

Ekscitotoksični efekat Glu ispoljava pre svega aktivacijom jonotropnih *NMDA* i *AMPA* receptora, i njihova intenzivna i produžena aktivacija dovodi do oštećenja neurona na nekoliko načina. Usled produžene depolarizacije membrane nastaje prva ili rana komponenta ekscitotoksičnosti koju čini povećani influks jona Na^+ i Cl^- i vode, koji dovode do bubrenja i oštećenja metaboličkih funkcija neurona. Produžena depolarizacija dovodi do povećanog influksa Ca^{2+} (aktiviranjem voltažno zavisnih Ca^{2+} kanala i povećanjem propustljivosti jonskih kanala udruženih sa *NMDA* receptorima), koji aktivira enzim koji konvertuje ksantin dehidrogenazu (XDH) u ksantin oksidazu (XOD) koja potom dovodi do stvaranja $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 i $\cdot\text{OH}$ (Mehta i sar., 2013). Influks Ca^{2+} iz ekstracelularnog prostora sa sobom dovodi do povećanog oslobađanja ovog katjona iz ćelijskih organela kao što su mitohondrije i endoplazmatski retikulum. Kiseonični radikali udruženo sa povećanom intracelularnom koncentracijom Ca^{2+} dovode do aktivacije brojnih enzima, razgradnje proteina, lipida i nukleinskih kiselina, izazivaju oštećenje membrana, citoskeleta i vode u nekrotičnu ćelijsku smrt (Lau i Tymianski, 2010). Takođe, poremećena homeostaza Ca^{2+} može aktivirati programiranu ćelijsku smrt tj. apoptozu, što predstavlja drugi važan mehanizam oštećenja neurona (Dong i sar., 2009). Preuzimanje Glu od strane astrocita može biti inhibisano dejstvom RVK, što je još jedan faktor u neurotoksičnosti (Volterra i sar., 1994).

Brojna istraživanja na životinjama su pokazala da do oštećenja ćelija u cerebrovaskularnim insultima, traumatskim povredama, neurodegenerativnim bolestima, hipoglikemiji i statusu epileptikusu dolazi upravo mehanizmom ekscitotoksičnosti (Dong i sar., 2009; Lewerenz i Maher, 2015).

U neurodegenerativnim bolestima osim povećane produkcije RVK, takođe je povećana je i sinteza NO kao posledica OS. U cerebrovaskularnim insultima proizvodnja NO je aktivirana povećanim oslobađanjem i smanjenim uklanjanjem Glu, što dovodi do hiperstimulacije *NMDA* receptora i povećanog influksa Ca^{2+} . Smatra se da su toksični efekti NO posledica povećane produkcije njegovog metabolita $ONOO^-$, koji je izuzetno reaktivan i dovodi do fragmentacije DNK, narušava prenos signala posredstvom tirozin kinaza, aktivira MT koje oštećuju ekstracelularni matriks što za posledicu ima apoptozu (Dong i sar., 2009).

Na modelima različitih oboljenja i patoloških stanja CNS-a u pacova pokazano je da različiti protokoli rTMS ispoljavaju protektivno dejstvo drugačijim mehanizmima kao što su: snižavanjem produkcije prooksidanasa i povećanim stvaranjem molekula i enzima AOZ-e, smanjenjem gubitka neurona inhibicijom apoptoze indukovane citohromom *c*, povećanjem produkcije neurotrofičnih faktora, indukovanjem neurogeneze, povećanjem ekspresije gena čiji proteinski produkti učestvuju u reparaciji i regeneraciji tkiva (Arias-Carrion, 2008; Lee i sar., 2013; Ljubisavljevic i sar., 2015; Sasso i sar., 2016; Tunez i sar., 2006).

II RADNE HIPOTEZE

Na osnovu navedenih podataka, a imajući u vidu da su molekularni i ćelijski mehanizmi neuroprotektivne i neuromodulatorne uloge TMS uprkos brojnim istraživanjima nerazjašnjeni, postavljene su sledeće radne hipoteze.

1. Jednokratni i višekratni protokoli intermitentne i kontinuirane *TBS* izazivaju promenu ekspresije membranskih i vezikularnih transportera za glutamat u motornoj kori, strijatumu, hipokampusu i malom mozgu mladih i adultnih pacova.

2. Jednokratni i višekratni protokoli intermitentne i kontinuirane *TBS* izazivaju promenu ekspresije neurotrofičnog faktora moždanog porekla u motornoj kori, strijatumu, hipokampusu i malom mozgu mladih i adultnih pacova.

3. Jednokratni i višekratni protokoli intermitentne i kontinuirane *TBS* ne menjaju značajno oksidativni status tkivnih komponenti u motornoj kori, strijatumu, hipokampusu i malom mozgu kod mladih i adultnih pacova

III CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U cilju rasvetljavanja uticaja protokola *TBS* na ekspresiju vezikularnih i membranskih transportera za glutamat, neurotrofičnog faktora moždanog porekla, kao i efekta na promene biohemijskih parametara oksidativnog stanja, a na osnovu izloženih hipoteza, ciljevi ovog istraživanja su bili:

1. Utvrditi uticaj jednokratne i višekratne primene TMS po protokolima *kTBS* i *iTBS* na promene u ekspresiji vezikularnog transportera za glutamat- *vGluT-1* i membranskih transportera za glutamat - *GLAST* i *GLT-1* u tkivu motorne kore, strijatuma, hipokampusa i malog mozga mladih i adultnih pacova.

2. Utvrditi razlike u ekspresiji vezikularnog transportera za glutamat- *vGluT-1* i membranskih transportera za glutamat - *GLAST* i *GLT-1*, u tkivu motorne kore, strijatuma, hipokampusa i malog mozga između mladih i adultnih pacova nakon jednokratne i višekratne primene TMS po protokolima *kTBS* i *iTBS*.

3. Utvrditi uticaj jednokratne i višekratne primene TMS po protokolima *kTBS* i *iTBS* na promene u ekspresiji neurotrofičnog faktora moždanog porekla u tkivu motorne kore, strijatuma, hipokampusa i malog mozga mladih i adultnih pacova.

4. Utvrditi razlike u ekspresiji neurotrofičnog faktora moždanog porekla u tkivu motorne kore, strijatuma, hipokampusa i malog mozga između mladih i adultnih pacova nakon jednokratne i višekratne primene TMS po protokolima *kTBS* i *iTBS*.

5. Utvrditi uticaj jednokratne i višekratne primene TMS po protokolima *kTBS* i *iTBS* na promene biohemijskih parametara oksidativnog stanja (lipidne peroksidacije, aktivnosti antioksidativnih enzima i koncentraciju glutaciona) u selektivno osjetljivim moždanim strukturama (motornoj kori, strijatumu, hipokampusu i malom mozgu) pacova.

6. Utvrditi razlike u biohemijskim parametrima oksidativnog stanja (lipidne peroksidacije, aktivnosti antioksidativnih enzima i koncentraciju glutaciona) u selektivno osjetljivim moždanim strukturama (motornoj kori, strijatumu, hipokampusu i malom mozgu) između mladih i adultnih pacova nakon pojedinačne i višekratne primene TMS po protokolima *kTBS* i *iTBS*.

7. Utvrditi povezanost promena biohemijskih parametara oksidativnog stanja i ekspresije transportera za glutamat u tkivu motorne kore, strijatuma, hipokampusa i malog mozga mladih i adultnih pacova nakon jednokratne i višekratne primene TMS po protokolima *kTBS* i *iTBS*.

8. Utvrditi povezanost promena ekspresije transportera za glutamat i neurotrofičnog faktora moždanog porekla u tkivu motorne kore, strijatuma, hipokampusa i malog mozga mladih i adultnih pacova nakon jednokratne i višekratne primene TMS po protokolima *kTBS* i *iTBS*.

9. Utvrditi povezanost promena biohemijskih parametara oksidativnog stanja i ekspresije neurotrofičnog faktora moždanog porekla u tkivu motorne kore, strijatuma, hipokampusa i malog mozga mladih i adultnih pacova nakon jednokratne i višekratne primene TMS po protokolima *kTBS* i *iTBS*.

IV MATERIJAL I METODE

IV 1. Eksperimentalni dizajn

1.1. Eksperimentalne životinje

U istraživanje su bili uključeni mužjaci pacova *Wistar* soja, starosti 4 nedelje (mladi) prosečne telesne mase (TM) 200 ± 50 grama, kao i adulti starosti 8 nedelja, prosečne telesne mase 400 ± 50 grama. Životinje su odgajene na Farmi za uzgoj laboratorijskih životinja Vojnomedicinske akademije (VMA) -Torlak, a zatim su prebačene i čuvane u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja VMA. Tokom rada sa životinjama poštovani su Etički principi rada na laboratorijskim životinjama Vojnomedicinske akademije u Beogradu, kao i Zakon o zaštiti i dobrobiti životinja („Službeni glasnik RS“, broj 41/09), koji poštuju pravila Direktive evropskog parlamenta o zaštiti životinja korišćenih za naučne svrhe 2010/63/EU od 22.09.2010. g. Eksperiment je odobren od strane Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije (br. 323-07-7363/2014-05/1). Životinje su čuvane u vivarijumu VMA u plastičnim kavezima sa žičanom rešetkom na vrhu, u klimatski kontrolisanim uslovima (temperatura od $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, relativna vlažnost vazduha od $55 \pm 3\%$, sa ciklusom svetlost/tama 12/12h). U svakom kavezu bilo je smešteno po šest životinja tokom celokupnog trajanja istraživanja. Sve životinje su tokom trajanja eksperimenta živele u podjednakim uslovima sa slobodnim pristupom hrani i vodi iz plastičnih pojilica (LM2, hrana za pacove u peletiranom obliku, Veterinarski zavod, Subotica). Nakon perioda prilagođavanja na laboratorijske uslove u trajanju od dve nedelje, sve ekperimentalne procedure na životinjama su izvođene između 8 i 13 časova.

1.2. Eksperimentalne grupe

Životinje istog uzrasnog doba, adulti i mladi pacovi, su metodom slučajnog uzorka podeljeni u dve podgrupe: podgrupu koja je tretirana jednokratno i podgrupu životinja koja je bila tretirana višekratno, u toku dve nedelje, po proceduri: svakodnevno petodnevno aplikovanje/ pauza dva dana/ svakodnevno petodnevno aplikovanje.

Stimulacija je vršena pomoću aparata *MagStim Rapid²* i kalema oblika osmice dijametra 25 mm (*MagStim Company, Whitli, Dyfed, UK*) položenom na glavu životinje u projekciji sagitalne linije. Kretanje pacova je bilo ograničeno od strane ispitivača. Protokoli *TBS* su primenjivani prema Huang i saradnici (Huang i sar., 2005). Magnetni stimulusi su primenjivani pri intenzitetu od 80% praga motornog nadražaja (definisano kao vidljive

kontrakcije prednjih ekstremiteta), na način da su grupe od tri stimulusa (interstimulusni interval ~ 10 ms; frekvencije 50 Hz) ponavljane ~ 170 ms (ukupno trajanje ciklusa ~ 200 ms – ekvivalent 5 Hz) bile primenjivane prema obrascima:

- Intermitetne *TBS* (*iTBS*), ukupno 600 stimulusa, na način stimulacije prema navedenom obrascu u trajanju od 2 sekunde, a potom 8 sekundi pauze (ukupno trajanje ciklusa 10 sekundi, a ukupno trajanje stimulacije koja se sastojala od 20 ciklusa je ~190 sekundi)

- Kontinuirane *TBS* (*kTBS*), ukupno 600 stimulusa, na način stimulacije prema navedenom obrascu bez pauza (jedan ciklus, ukupno trajanje stimulacije 40 sekundi).

U okviru podgrupa mladi i adulti, formirane su sledeće eksperimentalne grupe:

Podgrupa mladih životinja:

1. Placebo grupa mladih životinja „lažno“ jednokratno tretirana
2. Placebo grupa mladih životinja „lažno“ višekratno tretirana
3. Grupa mladih životinja jednokratno stimulisanih po protokolu *iTBS*
4. Grupa mladih životinja višekratno stimulisanih po protokolu *iTBS*
5. Grupa mladih životinja jednokratno stimulisanih po protokolu *kTBS*
6. Grupa mladih životinja višekratno stimulisanih po protokolu *kTBS*

Podgrupa adultnih životinja:

1. Placebo grupa adultnih životinja „lažno“ jednokratno tretirana
2. Placebo grupa adultnih životinja „lažno“ višekratno tretirana
3. Grupa adultnih životinja jednokratno stimulisanih po protokolu *iTBS*
4. Grupa adultnih životinja višekratno stimulisanih po protokolu *iTBS*
5. Grupa adultnih životinja jednokratno stimulisanih po protokolu *kTBS*
6. Grupa adultnih životinja višekratno stimulisanih po protokolu *kTBS*

Po završetku eksperimenta sve životinje iz jednokratno tretiranih podgrupa bile su nakon anestezije (pentobarbital-natrijum u dozi od 50 mg/kg TM) žrtvovane dekapitacijom, 24 sata nakon primenjenog eksperimentalnog protokola, a životinje iz višekratno tretiranih

grupa su na isti način biti žrtvovane 48 sati nakon poslednjeg primenjenog eksperimentalnog protokola.

IV 2. Imunomorfološke promene u selektivno osetljivim moždanim strukturama *Wistar* pacova

2.1. Priprema tkiva za imunohistohemijsku analizu

Za imunohistohemijsku analizu su iz svake eksperimentalne grupe po tri životinje najpre perfundovane sa 0,9 % fiziološkim rastvorom u zapremini od 50 ml i trajanju od 5 minuta, a zatim žrtvovane dekapitacijom. Mozgovi su prvo uronjeni u 4 % paraformaldehid (PFA) u 0,1M rastvoru fosfatnog pufera (*PBS*) pH 7,4 u kome su stajali 24 časa na temperaturi +4°C, i dalje u cilju dehidratacije prošli kroz seriju vodenih rastvora saharoze rastuće koncentracije 10 % - 30 % (30 % saharoza: 30 g saharoze u 100 ml prečišćene vode). Nakon toga, tkiva su uronjena u medijum za kalupljenje i zamrzavana u 2-metilbutanu okruženom suvim ledom. Nakon zamrzavanja, kalupi su čuvani na –80°C do dalje obrade. Kriostatski koronalni preseki tkiva mozga pravljani su na kriotomu (*Leica CM 1850*) na temperaturi od –21°C, debljine 20µm (George Paxinos, 2005). Nakon sušenja na sobnoj temperaturi, mikroskopske pločice čuvane su na –20 °C do analize.

2.2. Imunohistohemijsko markiranje

Od imunohistohemijskih tehnika korišćena je metoda imunofluorescence. Primenjeno je jednostruko bojenje primarnim zečijim poliklonskim anti-*BDNF* antitelom (razblaženje 1:50, *Invitrogen*, SAD) i sekundarnim anti-zečijim antitelom konjugovanim sa *Alexa fluor 488*[®] (razblaženja 1:500, *Abcam*, UK). Dvostruko imunohistohemijsko bojenje vršeno je specifičnim primarnim zečijim poliklonskim anti-*vGluT-1* (razblaženje 1:50, *Invitrogen*, SAD), anti-*GLAST* (razblaženje 1:200, *Abcam*, UK) i anti-*GLT-1* (razblaženje 1:500, *Abcam*, UK) antitelima sa sekundarnim anti-zečijim antitelom konjugovanim *Alexa fluor 488*[®] (razblaženja 1:500, *Abcam*, UK). Kao drugo primarno antitelo u dvostrukoj imunofluorescenci korišćeno je mišije poliklonsko anti-*GFAP* (razblaženje 1:1000, *Abcam*, UK) antitelo sa sekundarnim anti-mišijim antitelom konjugovanim sa *Alexa fluor 555*[®] (razblaženja 1:250, *Invitrogen*, SAD). Sva antitela su razblaživana u puferizovanom fosfatnom rastvoru (eng. *phosphate buffered sollution*, *PBS*).

Kriostatski preseki moždanog tkiva nakon odmrzavanja na sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta podvrgnuti su sledećoj proceduri markiranja:

1. Ispiranje dva puta po 5 minuta u *PBS*
2. Inkubacija 30 minuta sa 1% rastvorom kristalizovanog serumskog albumina govečeta (eng. *bovine serum albumin, BSA*)
3. Inkubacija sa primarnim antitelima (anti-*BDNF*, anti-*GLAST*, anti-*GLT-1* i anti-*vGluT-1*) u vlažnoj komori preko noći na +4°C
4. Ispiranje dva puta po 5 minuta u *PBS*
5. Inkubacija sa sekundarnim anti-zečijim antitelom konjugovanim sa *Alexa fluor 488*[®], razblaženja 1:500, 2 časa na +4°C u vlažnoj komori
6. Ispiranje dva puta po 5 minuta u *PBS*
7. Kod dvostrukog imunofluorescentnog bojenja inkubacija sa drugim primarnim antitelom anti-*GFAP* u vlažnoj komori preko noći na +4°C *
8. Ispiranje dva puta po 5 minuta u *PBS*
9. Inkubacija sa sekundarnim anti-mišijim antitelom konjugovanim sa *Alexa fluor 555*[®], razblaženja 1:250, 2 časa na +4°C u vlažnoj komori
10. Ispiranje dva puta po 5 minuta u *PBS*
11. Bojenje jedara 4',6-diamidino-2-fenilindolom (eng. *4,6-diamidino-2 phenylindole, DAPI*) razblaženja 1:20000 u trajanju od 2 minuta
12. Ispiranje dva puta po 5 minuta u *PBS*
13. Montiranje preseka u medijumu (rastvor glicerola i *PBS* u odnosu 1:1)

* Preseci pacovskih tkiva koji su jednostruko markirani primarnim anti-*BDNF* antitelom su podvrgnuti istoj proceduri od stavke 1 do 6, potom od stavke 11 do 13.

2.3. Analiza intenziteta imunofluorescence

Obojeni preseci su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom (*Olympus, BX61*, Japan) i fotografisani (*Olympus LTP 701*, Japan), a vizuelizacija fluorofora je vršena živinom fluorescentnom lampom (*X-cite series 120, Excelitas Technologies, SAD*) pod istim uslovima. Za određivanje fluorescence analizirana su po tri preseka tkiva motorne kore, strijatuma, hipokampusa i malog mozga od po tri životinje u svakoj eksperimentalnoj grupi. Za svaki presek je načinjeno po pet fotografija na uveličanju 20x. Intenzitet fluorescence je

određivan semikvantitativnom metodom upotrebom *Image J software*. Sa svake fotografije su uklonjeni artefakti i urađena je korekcija slike, nakon čega je određen prag intenziteta fluorescence i predstavljen kao srednja vrednost sive skale.

IV 3. Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u homogenatima tkiva mozga *Wistar* pacova

Za procenu uticaja *TBS* na oksidativni status u moždanom tkivu određivani su koncentracija tiobarbiturna kiselina-reagujućih supstanci (eng. *thiobarbituric acid reactive species TBARS*), proizvodnja superoksid anjon radikala ($O_2^{\bullet-}$), aktivnost superoksid dizmutaze (SOD), koncentracija ukupnih sulfhidrilnih grupa (SH), sadržaj redukovanog glutationa (GSH), kao i aktivnost glutation reduktaze (GR) i glutation-S- transferaze (GST).

3.1. Priprema homogenata tkiva mozga *Wistar* pacova za biohemijsku analizu

Nakon uvođenja u anesteziju, životinje su žrtvovane dekapitacijom. Tkivo mozga zamrzavano je u tečnom azotu i ostavljeno na $-80^{\circ}C$ za dalju analizu. Glave su nepotpuno odmrzavane, a zatim su na ledu ($0-4^{\circ}C$) vađeni mozgovi i izdvajano je tkivo motorne kore, strijatuma, hipokampusa i malog mozga.

Priprema tkiva mozga za analize vršena je homogenizacijom u 1ml hladnog puferizovanog saharoznog medijuma (0,25 M/l saharoza, 0,1 mM/l *EDTA* i 50 mM K-Na fosfatni pufer, pH 7,2), u staklenom homogenizeru sa teflonskim tučkom na 800 obrtaja/min (*Schüett-biotec, Göttingen, Nemačka*). Nakon dva uzastopna centrifugiranja (*J 2-21 centrifuge, Beckman, Nemačka, rotor J-20*) na 3500 obrtaja/min u trajanju od 15 minuta na $+4^{\circ}C$, odvojeni supernatant je sonifikovan (*MSE, P631555*), radi liziranja membrana subcelularnih struktura. Dobijeni uzorak predstavlja neprečišćenu mitohondrijalnu frakciju (Gurd i sar., 1974). Sonifikacija je izvedena u tri ciklusa po 30 sekundi sa 5 sekundi pauze između ciklusa, a talog je odbacivan. Dobijeni uzorci čuvani su na $-80^{\circ}C$ za dalje određivanje parametara oksidativnog stresa i AOZ.

Posebna priprema tkiva vršena je za određivanje koncentracije GSH. Nakon nepotpunog odmrzavanja glava, izdvojene su selektivno osetljive moždane stukture i zatim homogenizovane u 1ml 10% sulfosalicilne kiseline, u staklenoj epruveti za homogenizaciju sa teflonskim tučkom, na 800 obrtaja/min (*Schüett-biotec, Göttingen, Nemačka*). Nakon centrifugiranja u plastičnim epruvetama 25 min na 8000 obrtaja/min na $+4^{\circ}C$, supernatant je izdvojen za spektrofotometrijsku analizu ili čuvan u plastičnim mikroeprevetama na $-80^{\circ}C$

do momenta određivanja GSH. Izdvojeni talog je rastvoren u 0,1 M NaOH i nakon 24 h spektrofotometrijski je određena koncentracija proteina.

3.2. Određivanje koncentracije proteina u homogenatima tkiva

Parametri oksidativnog stresa i AOZ izražavani su na mg proteina, tako da je pre svih merenja u homogenatima tkiva najpre određen sadržaj proteina metodom po *Lowry*-ju (*Lowry i sar.*, 1951). Metoda se zasniva na biuretskoj reakciji peptidnih veza i jona bakra u alkalnoj sredini i reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframskog reagensa sa aromatičnim amino kiselinama u polipeptidnim lancima. Kao sti ard korišćen je *BSA* (eng. *bovine serum albumin*). U reakciji nastaje jedinjenje plave boje, čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji proteina. Najpre je 10 µl uzorka inkubirano 10 minuta na sobnoj temperaturi sa reakcionom smešom do 1 ml: 2 ml 0,5 % CuSO_4 i do 100 ml *Stock Lowry* reagensa (10 g Na-karbonat, 10 mL 5 M/l NaOH, 100 mg K-Na tartarata i H_2O do 500 ml). Slepna proba (1 ml reakcione smeše) i sti ardi (10, 20, 30, 40, 50 µl *BSA*, poznate koncentracije proteina 1 mg/ml, uz dodatak reakcione smeše do 1 ml) su takođe 10 minuta inkubirani na sobnoj temperaturi. Zatim je u sve epruvete (uzorci, slepa proba, sti ardi) dodato po 100 µl *Follin* reagensa i inkubirano 30 minuta na sobnoj temperaturi. Intenzitet plave boje meren je spektrofotometrijski na 575 nm (*Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, UK*). Koncentracija proteina u uzorku izražavana se u µg/ml homogenata tkiva.

3.3. Određivanje koncentracije *TBARS* u tkivu

Reakcija malondialdehida (*MDA*) i drugih *TBARS* sa tiobarbiturnom kiselinom (*TBA*) u tkivu dovodi do stvaranja kompleksnih jedinjenja bledežute boje čiji se intenzitet meri spektrofotometrijski (*Girotti i sar.*, 1991).

Reakcionu smešu *TBA* reagensa čine 15 % trihlorsirćetna kiselina, 0,375 % tiobarbiturna kiselina i 0,25 M/l hlorovodonične kiseline. U epruvete je odmeravano 200 µl razblaženog homogenata (50 µl homogenata + 150 µl prečišćene vode) i 400 µl *TBA* reagensa, zatim zagrevano na 95°C tokom 5 minuta u vodenom kupatilu. Nakon hlađenja izvršeno je centrifugiranje 1 minut na 3000 obrtaja/min, nakon čega je po 300 µl supernatanta razliveno u ploču i merena je apsorbancija u odnosu na slepu probu. Vrednost apsorbancije očitavana je na *ELISA* spektrofotometru pri mernoj talasnoj dužini od 492 nm i referentnoj talasnoj dužini od 650 nm (*SynergyHT, BioTek, SAD*).

Za kalibracionu krivu i regresionu jednačinu, napravljen je radni standardni rastvor MDA koncentracije 1 mM/L, a zatim serija mernih rastvora koncentracija 10, 50, 100, 150 i 200 μ M/L. Koncentracija *TBARS* izražavana je u nM *TBARS*/mg proteina.

3.4. Određivanje superoksidnog anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$)

Redukcija nitroblu tetrazolijuma (NBT) do nitroblu-formazana koristi se kao mera stvaranja $O_2^{\cdot-}$ u hemijskim i biološkim sistemima (Auclair C., 1985). U oksidovanoj formi NBT je žuta supstanca rastvorljiva u vodi, dok je u redukovanoj formi intenzivno plave boje i smanjene rastvorljivosti. Superoksid-zavisna redukcija NBT odvija se do monoformazana. Reakciona smeša je sadržala 1 mM NBT (rastvorenog u 0,05 M fosfatnom puferu sa 0,1 mM *EDTA*, pH 8,6) i 0,1 mg/ml želatina, koji NBT-formazan održava u rastvoru. Rastvor NBT je jedan sat bio izložen dejstvu azota pod pritiskom, što je imalo za cilj da istisne kiseonik iz medijuma. Reakcija je otpočinjala dodavanjem 0,05 ml uzorka u 1 ml reakcione smeše, a promena ekstinkcije praćena je u toku 5 minuta na talasnoj dužini 550 nm (*Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, UK*). Stvaranje $O_2^{\cdot-}$ izražavano je kao nM redukovanog NBT/min/mg proteina.

3.5. Određivanje aktivnosti ukupne superoksid dismutaze

Aktivnost ukupne SOD u homogenatima tkiva određivana je pomoću komercijalnog kita (*Ransod Kit, Ri ox reagents, UK*). Analiza se zasniva na reakciji $O_2^{\cdot-}$, generisanim ksantinom i ksantin oksidazom sa 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum hloridom (INT) pri čemu se stvara formazan crvene boje. Aktivnost SOD je predstavljena stepenom inhibicije ove reakcije. Jedna jedinica SOD za 50 % inhibira brzinu redukcije INT pod definisanim uslovima. Intenzitet crvene boje formiranog formazana je meren na talasnoj dužini 505 nm (*Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, UK*). Dobijeni rezultati za aktivnost ukupne SOD se izražavaju u internacionalnim jedinicama po miligramu proteina (IJ /mg proteina).

3.6. Određivanje sadržaja ukupnih sulfhidrilnih grupa

Ukupni sulfhidrilni sadržaj (SH) u homogenatima tkiva mozga određivan je Elmanovom metodom (Elman, 1959). Ova metoda zasniva se na reakciji 2,2-dinitro-5,5-ditio-benzoeve kiseline (DTNB) sa alifatičnim tiolnim jedinjenjima u baznoj sredini pri pH 9, pri čemu se stvara jedan mol p-nitrofenol anjona po jednom molu tiola. Žuta boja anjona koja određuje intenzitet apsorbancije merena je na 412 nm. U 50 μ l uzorka dodato je 900 μ l pufera (0,2 M/L K_2HPO_4 , 2 mM/L EDTA, pH 9,0) i 20 μ l DTNB (0,01 M/L DTNB rastvoren u 50 mM/l fosfatnog pufera, pH 7,0). U slepu probu je dodato 20 μ l DTNB i 950 μ l pufera. Nakon mešanja na vorteksu uzorci su inkubirani 25 minuta na sobnoj temperaturi i apsorbancija je čitana na 412 nm prema slepoj probi (*Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, UK*). Koncentracija SH sadržaja u tkivu mozga izračunata je preko molarnog ekstinkcionog koeficijenta p-nitrofenola na 412 nm, koji za date uslove ima vrednost od $13.600 \text{ l} \times \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Sadržaj SH grupa izražen je u $\mu\text{M} / \text{mg}$ proteina.

3.7. Određivanje koncentracije redukovano glutationa

Metoda određivanja sadržaja GSH u tkivu se zasniva na reakciji 2,2-dinitro-5,5-ditio-benzoeve kiseline (DTNB) sa alifatičnim tiol jedinjenjima pri pH 8, stvarajući p-nitrofenil anjon žute boje. Intenzitet žute boje se koristio za merenje koncentracije GSH spektrofotometrijski. Reakciona smeša se sastojala od 400 μ l pufera (0,4 M TRIS HCl pH 8,9), 800 μ l prečišćene vode, 100 μ l uzorka i 10 μ l DTNB (10mM u metanolu). U slepu probu umesto uzorka je dodata 10 % sulfosalicilna kiselina. Kao standard korišćen je rastvor GSH (167 μM u prečišćenoj vodi) od kojeg su pravljena odgovarajuća razblaženja. Nakon inkubacije pripremljenih rastvora u trajanju od 20 minuta, ekstinkcija je očitavana na talasnoj dužini 412nm (*Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, UK*). Koncentracija GSH je izražena u nM /mg proteina.

3.8. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze

Aktivnost GR u homogenatima tkiva je određivana pomoću komercijalnog kita (*Glutathione Reductase Assay Kit, Sigma, SAD*). Metoda se zasniva na redukciji oksidovanog glutationa (GSSG) do GSH pomoću NADPH kao donora redukujućih ekvivalenta u prisustvu GR. Formirani GSH dovodi do redukcije DTNB u 5-tio 2-nitrobenzojevu kiselinu (TNB). Nivo stvaranja TNB je proporcionalan ukupnoj aktivnosti GR. Na ELISA ploči pipetirano je 10 μ l uzorka i 80 μ l radnog pufera (100 mM K-fosfatni pufer sa 1 mM EDTA, pH 7,5). Kao

slepa proba umesto uzorka korišćen je pufer za GR (100 mM K-fosfatni pufer sa 1 mM EDTA i 0,1% rastvor BSA, pH 7,5). Kao standard u reakciji korišćena je GR čija je aktivnost 678,9 IJ/ml, od koje su pravljena odgovarajuća razblaženja. Reakcija je započeta dodavanjem reakcione smeše koju su činili 50 μ l DTNB (3 mM DTNB u radnom puferu), 10 μ l NADPH (2 mM NADPH u radnom puferu) i 100 μ l GSSG (2mM GSSG u radnom puferu). Nakon 60 sekundi inkubacije reakcione smeše, ekstinkcija je očitavana spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 412nm na svakih 16 sekundi, kako bi se dobile vrednosti za devet ciklusa (*Synergy HT, BioTek, SAD*). Aktivnost GR predstavljena je internacionalnim jedinicama po miligramu proteina (IJ/mg proteina), gde jedna IJ GR odgovara redukciji 1 μ M DTNB-a u TNB.

3.9. Određivanje aktivnosti glutathion S-transferaze

Aktivnost GST u homogenatima tkiva određivana je pomoću komercijalnog kita (*Glutathione S- transferases Assay, Science Cell, SAD*). Metoda se zasniva na konjugaciji tiolne grupe GSH sa 1-hloro-2-dinitrobenzenom, što dovodi do porasta apsorbancije koja je proporcionalna aktivnosti GST. Promena apsorbancije se očitava na talasnoj dužini od 340 nm na svakih 60 sekundi, da bi se dobile vrednosti za šest ciklusa. Dobijeni rezultati za aktivnost GST se izražavaju u internacionalnim jedinicama po miligramu proteina (IJ/mg proteina). Jedna IJ GST uzrokuje nastanak 1 μ M GS-DNB konjugata u minuti pod definisanim uslovima..

IV 4. Vrsta studije, veličina uzorka i statistička obrada rezultata

Tip studije prema kome je sprovedeno istraživanje u celini je eksperimentalna studija na životinjama *in vivo*.

Veličina uzorka izračunata je na osnovu očekivanih vrednosti parametara oksidativnog statusa u eksperimentalnim grupama. Studijski uzorak izračunat je uzimajući da je $\alpha = 0,05$, a snaga studije 0,8 za nezavisni t test, poredeći grupe među sobom (u oba smera), prema statističkom programu *G*Power3.1*. Studijski uzorak koji pretpostavlja utvrđivanje statistički značajne razlike (nezavisni t test ili *Mann-Whitney* test) između dve izmerene varijable omogućava snagu studije ≥ 80 %.

Sve dobijene vrednosti su prezentovane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). Nakon testiranja normalnosti raspodele varijabli po grupama, za utvrđivanje statističke značajnosti korišćeni su sledeći testovi: analiza varijanse (ANOVA) i nezavisni t test za obeležja sa normalnom raspodelom. Za testiranje zavisnosti između pojedinih varijabli

korišćen je test linearne regresije uz utvrđivanje i testiranje *Spearman*-ovog koeficijenta korelacije. Za statističku obradu dobijenih rezultata korišćen je komercijalni programski paket *GraphPad Prism*, verzija 5.03. Statistička značajnost određena je na $p < 0,05$.

V REZULTATI

V 1. Efekti *TBS* i *KTBS* na intenzitet imunofluorescence u moždanim strukturama *Wistar* pacova

1.1. Efekat *iTBS* i *KTBS* na ekspresiju *vGluT-1* u moždanim strukturama *Wistar* pacova

Rezultati ekspresije *vGluT-1* u moždanim strukturama kod placebo i stimulisanih (*iTBS*, *KTBS*) grupa prikazani su za motornu koru na slici V 1.1. a, strijatum na slici V 1.1. b, hipokampus na slici V 1.1. c i mali mozak na slici V 1.1. d.

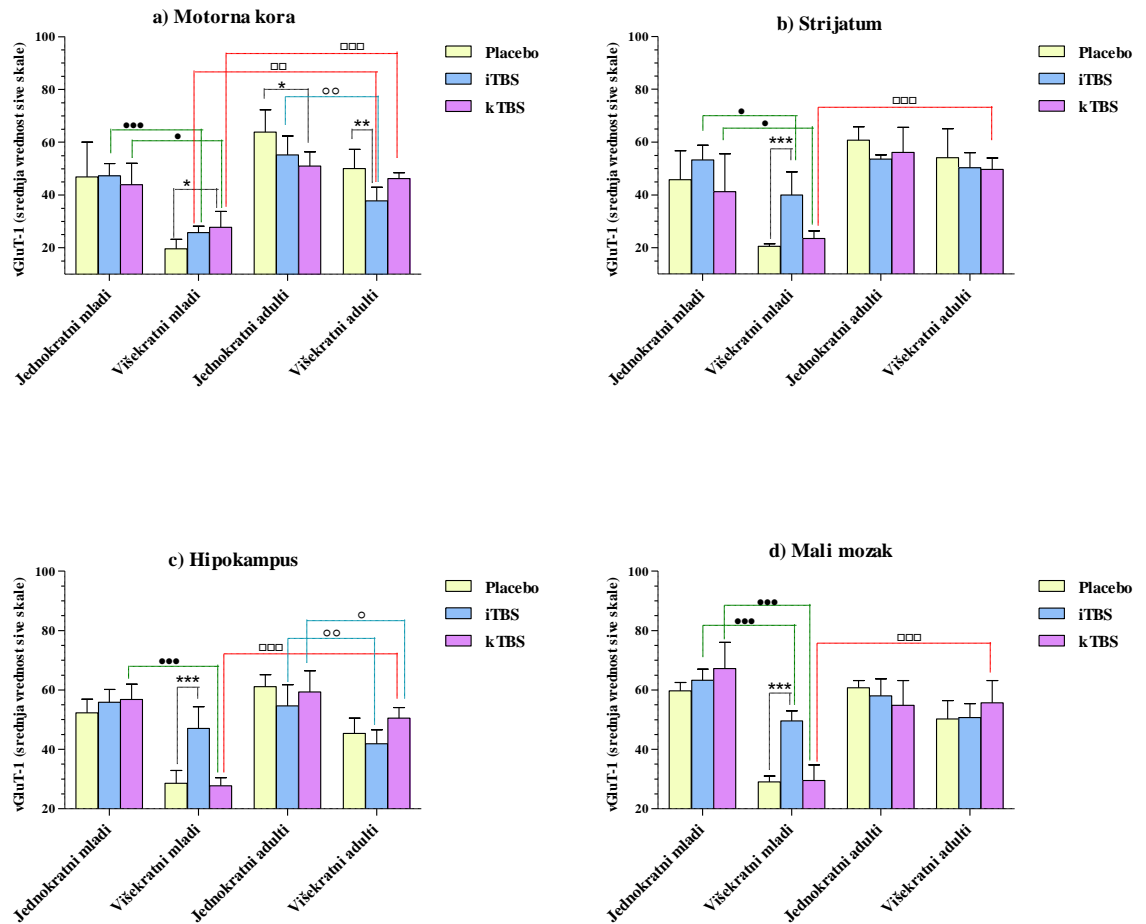
U motornoj kori (slika V 1.1. a) ekspresija *vGluT-1* je povećana nakon višekratne *KTBS* u grupi mladih životinja u odnosu na placebo ($p < 0,05$). Kod adulta višekratna *iTBS* dovodi do smanjenja ekspresije *vGluT-1* ($p < 0,01$) u odnosu na placebo grupu. U odnosu na placebo i jednokratna primena *KTBS* kod adultnih životinja dovela je do smanjenja ekspresije *vGluT-1*. Poređenjem višekratne u odnosu na jednokratnu stimulaciju (*iTBS*, *KTBS*) beleži se smanjena ekspresija transportera kod višekratno tretiranih mladih životinja. Kod adulta, manja ekspresija *vGluT-1* registrovana je nakon primene višekratnog *iTBS* protokola. Nakon višekratne primene oba protokola nađena je smanjena ekspresija *vGluT-1* u motornoj kori mladih životinja u odnosu na adulte.

Ekspresija *vGluT-1* u strijatumu (slika V 1.1. b) mladih životinja nakon višekratne *iTBS* je povećana u odnosu na placebo grupu ($p < 0,001$). Višekratna u odnosu na jednokratnu primenu oba protokola pokazuje manju ekspresiju transportera kod mladih životinja ($p < 0,05$). Višekratna primena *KTBS* smanjuje *vGluT-1* u grupi mladih životinja u odnosu na adulte ($p < 0,001$).

U hipokampusu (slika V 1.1. c) mladih životinja registrovana je povećana ekspresija *vGluT-1* nakon višekratne *iTBS* u odnosu na placebo ($p < 0,001$). Manja ekspresija transportera nakon *KTBS* kod mladih, kao i nakon primene oba protokola (*iTBS*, *KTBS*) kod adulta registrovana je nakon višekratne u odnosu na jednokratne stimulaciju. Manja ekspresija *vGluT-1* nakon višekratne *KTBS* registrovana je u hipokampusu mladih životinja u odnosu na adulte ($p < 0,001$).

Višekratna primena *iTBS* povećava ekspresiju *vGluT-1* u malom mozgu mladih životinja u odnosu na placebo (slika V 1.1. d). Takođe, u grupi mladih životinja manja imunofluorescenca registrovana je nakon višekratne u odnosu na jednokratnu primenu oba

protokola ($p < 0,001$). Nakon višekratne primene *kTBS* u grupi mladih u odnosu na adulte registruje se manja ekspresija *vGluT-1* ($p < 0,001$).



Slika V 1.1. Ekspresija vezikularnog glutamatnog transportera 1 (*vGluT-1*) u a) motornoj kori, b) strijatumu, c) hipokampusu i d) malom mozgu mladih i adultnih *Wistar* pacova u placebo grupi i nakon intermitentne i kontinuirane stimulacije teta praskovima (*iTBS*, *kTBS*).

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost srednje vrednosti sive skale \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku stimulisanih životinja u odnosu na placebo pacove (*), višekratno stimulisane u odnosu na jednokratno stimulisane mlade životinje (*), višekratno stimulisane u odnosu na jednokratno stimulisane adultne životinje (°) i višekratno stimulisane mlade u poređenju sa višekratno stimulisanim adultnim životinjama (□). (*, °, p < 0,05; **, °°, p < 0,01; ***, °°, □□, p < 0,001)

1.2. Efekat *iTBS* i *kTBS* na ekspresiju *GLAST* u moždanim strukturama *Wistar* pacova

Ekspresija *GLAST* u moždanim strukturama kod placebo i stimuliranih (*iTBS*, *kTBS*) grupa prikazana je za motornu koru na slici V 1.2. a, strijatum na slici V 1.2. b, hipokampus na slici V 1.2. c i mali mozak na slici V 1.2. d.

Ekspresija *GLAST* u motornoj kori (slika V 1.2. a) povećana je nakon višekratne primene *iTBS* ($p < 0,05$) i *kTBS* ($p < 0,001$) u grupi mladih životinja u odnosu na placebo. Kod višekratne u odnosu na jednokratnu primenu *iTBS* registruje se manji intenzitet fluorescence transportera kod mladih životinja ($p < 0,001$).

Višekratna *kTBS* povećava ekspresiju *GLAST* u odnosu na placebo u strijatumu mladih pacova (slika V 1.2.b). Kod višekratno stimuliranih mladih životinja u odnosu na jednokratno tretirane *iTBS*om registruje se manja ekspresija *GLAST* ($p < 0,001$), dok *kTBS* izaziva suprotni efekat- znatno veći intenzitet fluorescence *GLAST* kod višekratno tretiranih u odnosu na pojedinačno stimulirane mlade životinje ($p < 0,01$). Kod jednokratno tretiranih mladih u poređenju sa adultnim životinjama beleži se manja ekspresija transportera nakon oba *TBS* protokola ($p < 0,05$). Poređenjem mladih i adultnih životinja koje su tretirane višekratno, kod mladih se registruje manja ekspresija *GLAST* nakon *iTBS* i veća ekspresija transportera nakon *kTBS*.

U odnosu na placebo grupu, u hipokampusu (slika V 1.2. c) mladih životinja, jednokratna primena *iTBS* povećava ($p < 0,05$), dok višekratna stimulacija istim protokolom smanjuje *GLAST* ($p < 0,001$). Jednokratna primena *kTBS* kod mladih životinja smanjuje ekspresiju transportera u odnosu na placebo grupu ($p < 0,05$). Kod adulta je registrovano povećanje *GLAST* nakon jednokratne *kTBS* u odnosu na placebo ($p < 0,01$). Manja ekspresija transportera izmerena je nakon višekratne u odnosu na jednokratnu *iTBS* kod mladih životinja, dok je kod višekratno tretiranih adulta znatno manja ekspresija *GLAST* izmerena u odnosu na jednokratnu primenu *kTBS* ($p < 0,001$). Jednokratna stimulacija *iTBS* povećava, dok *kTBS* smanjuje ekspresiju transportera kod mladih u odnosu na adulte. Višekratna primena *iTBS* smanjuje *GLAST* kod mladih u odnosu na adulte ($p < 0,01$).

U regionu malog mozga (slika V 1.2. d), jednokratna primena oba protokola kod mladih životinja, kao i jednokratna primena *kTBS* kod adulta povećava ekspresiju *GLAST* u poređenju sa placebo grupom. Poređenjem višekratne u odnosu na jednokratnu primenu *kTBS* protokola registruje se manja ekspresija *GLAST* i kod mladih ($p < 0,01$) i kod adulta ($p < 0,001$)

1.3. Efekat *iTBS* i *kTBS* na ekspresiju *GLT-1* u moždanim strukturama *Wistar* pacova

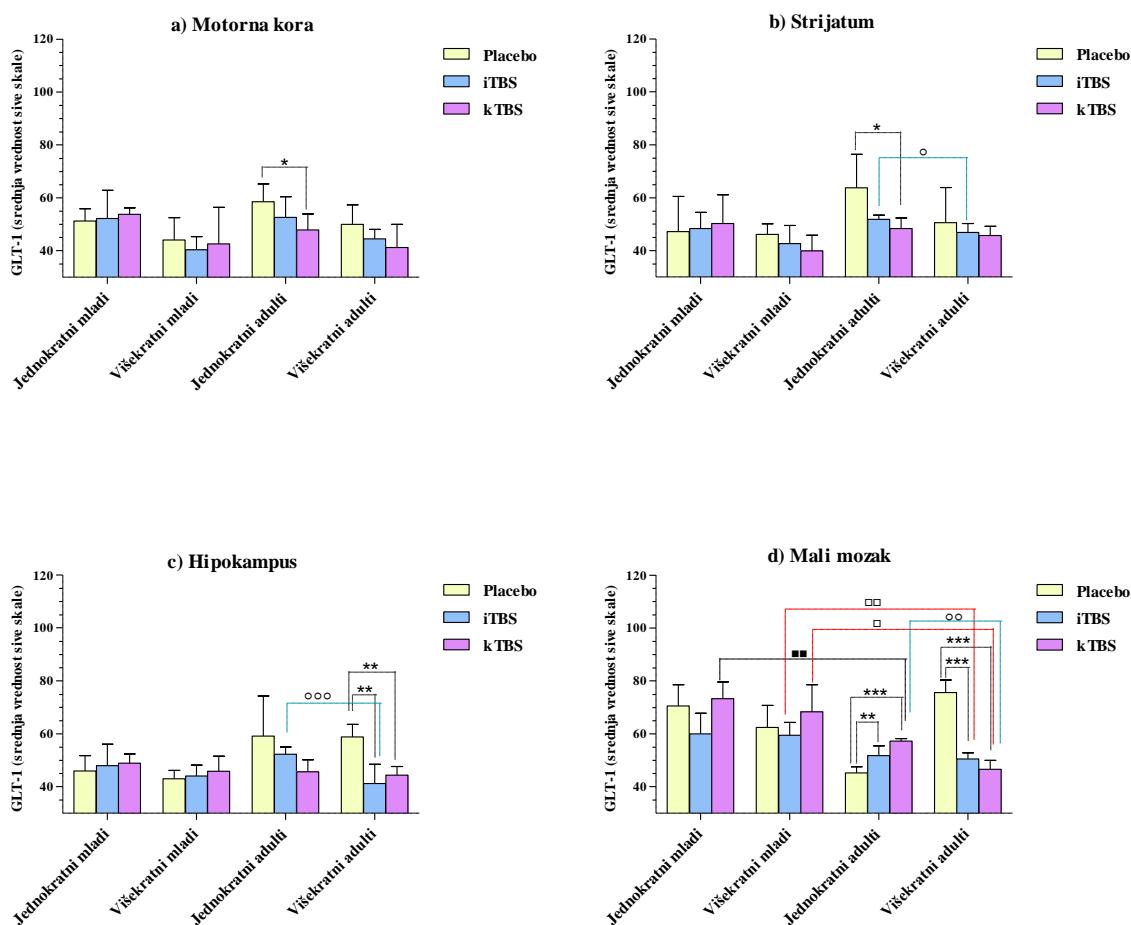
Ekspresija *GLT-1* u moždanim strukturama kod placebo i stimuliranih (*iTBS*, *kTBS*) grupa prikazana je za motornu koru na slici V 1.3. a, strijatum na slici V 1.3. b, hipokampus na slici V 1.3. c i mali mozak na slici V 1.3. d.

U motornoj kori adultnih životinja (slika V 1.3. a) ekspresija *GLT-1* smanjena je nakon jednokratne *kTBS* ($p < 0,05$) u odnosu na placebo.

Jednokratna *kTBS* smanjuje ekspresiju *GLT-1* u odnosu na placebo grupu u strijatumu adultnih pacova (slika V 1.3. b). U grupi adultnih životinja intenzitet fluorescencije *GLT-1* nakon višekratne *iTBS* u odnosu na jednokratno tretirane životinje je smanjen ($p < 0,05$).

U hipokampusu (slika V 1.3. c) adultnih životinja, nakon višekratne primene oba *TBS* protokola registruje se smanjenje *GLT-1* u odnosu na placebo grupu ($p < 0,01$). Poređenjem višekratne sa jednokratnom primenom *iTBS* kod adultnih životinja, uočava se smanjena ekspresija transportera nakon višestruke stimulacije ($p < 0,001$).

U poređenju sa placebo grupom, jednokratna primena oba protokola (*iTBS*, *kTBS*) povećava, dok višekratna smanjuje ekspresiju *GLT-1* u regionu malog mozga adultnih životinja (slika V 1.3. d). Kod višekratno tretiranih adulta, u odnosu na jednokratno stimulirane *kTBS*om, registruje se manja ekspresija *GLT-1* ($p < 0,01$). U malom mozgu mladih u odnosu na adulte, nakon primene jednokratne *kTBS* nalazi se veći intenzitet fluorescencije *GLT-1*. Poređenjem višekratno tretiranih mladih životinja u odnosu na adultne grupe, nakon primene oba protokola *TBS* registruje se veća ekspresija *GLT-1*.



Slika V 1.3. Ekspresija transportera ekscitatornih amino-kiselina 2 (GLT-1) u a) motornoj kori, b) strijatumu, c) hipokampusu i d) malom mozgu mladih i adultnih Wistar pacova u placebo grupi i nakon intermitentne i kontinuirane stimulacije teta praskovima (iTBS, kTBS).

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost srednje vrednosti sive skale \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku stimulisanih životinja u odnosu na placebo pacove (*), višekratno stimulisane u odnosu na jednokratno stimulisane adultne životinje (^o) jednokratno stimulisane mlade u poređenju sa jednokratno stimulisanim adultnim životinjama (^o) i višekratno stimulisane mlade u poređenju sa višekratno stimulisanim adultnim životinjama (^o). (*, ^o, [□] p<0,05; **, ^{oo}, **, ^{□□} p<0,01; ***, ^{ooo} p<0,001)

1.4. Efekat *iTBS* i *kTBS* na ekspresiju *BDNF* u moždanim strukturama *Wistar* pacova

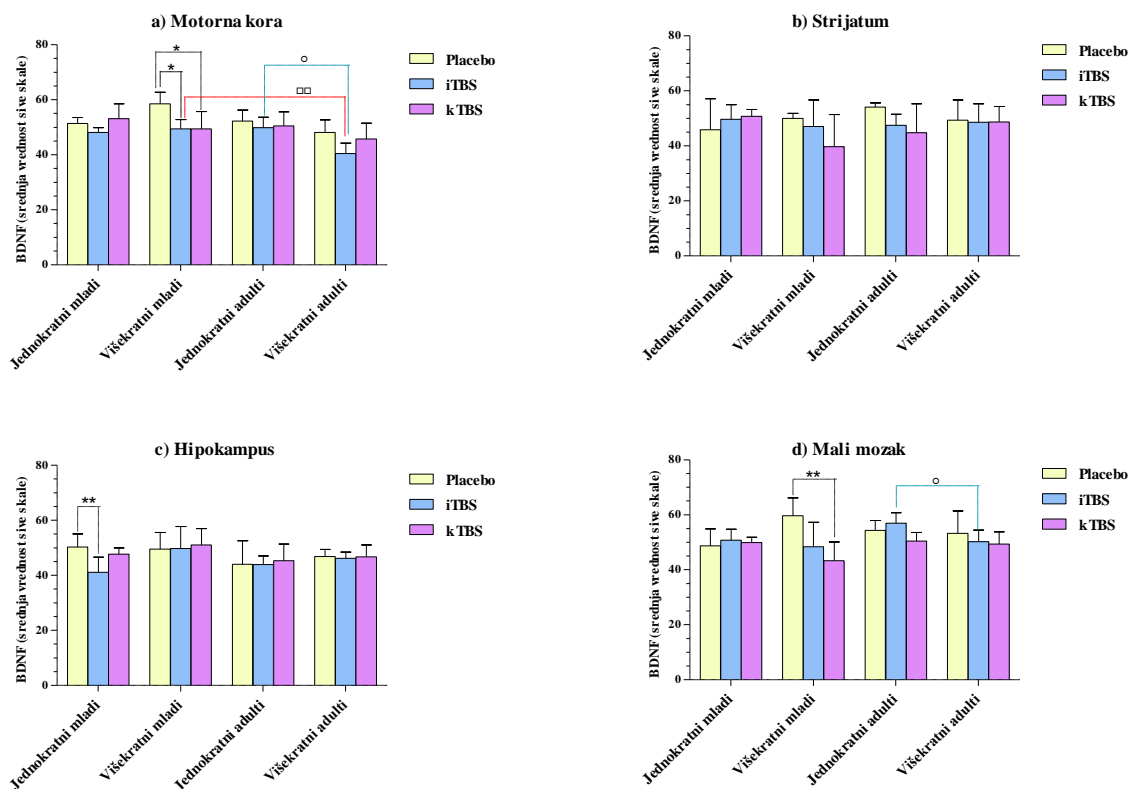
Rezultati ekspresije *BDNF* u moždanim strukturama kod placebo i stimulisanih (*iTBS*, *kTBS*) grupa prikazani su za motornu koru na slici V 1.4. a, strijatum na slici V 1.4. b, hipokampus na slici V 1.4. c i mali mozak na slici V 1.4. d.

Ekspresija *BDNF* u motornoj kori mladih životinja (slika V 1.4. a) smanjena je nakon višekratne primene oba *TBS* protokola u odnosu na placebo ($p < 0,05$). Višekratna primena *iTBS* smanjuje ekspresiju *BDNF* u poređenju sa jednokratnim tretmanom u motornoj kori adultnih životinja ($p < 0,05$). Poređenjem višekratno tretiranih mladih životinja u odnosu na adultne grupe, nakon primene *iTBS* registruje se veća ekspresija *BDNF* ($p < 0,01$).

U strijatumu nisu zabeležene promeneu ekspresiji *BDNF* nakon primene *TBS* protokola (slika V 1.4. b).

U hipokampusu mladih životinja jednokratno tretiranih sa *iTBS* (slika V 1.4. c), smanjen je intenzitet fluorescence *BDNF* u poređenju sa placebo grupom ($p < 0,01$).

Višekratna primena *kTBS* smanjuje ekspresiju *BDNF* u malom mozgu mladih životinja u poređenju sa placebo grupom ($p < 0,01$). Višekratna primena *iTBS* smanjuje *BDNF* u poređenju sa jednokratnim tretmanom kod adultnih životinja u regionu malog mozga (slika V 1.4. d).



Slika V 1.4. Ekspresija neurotrofičnog faktora moždanog porekla (*BDNF*) u a) motornoj kori, b) strijatumu, c) hipokampusu i d) malom mozgu mladih i adultnih *Wistar* pacova u placebo grupi i nakon intermitentne i kontinuirane stimulacije teta praskovima (*iTBS*, *kTBS*).

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost srednje vrednosti sive skale \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku stimulisanih životinja u odnosu na placebo pacove (*), višekratno stimulisane u odnosu na jednokratno stimulisane adultne životinje (^o) i višekratno stimulisane mlade u poređenju sa višekratno stimulisanim adultnim životinjama ([□]). (*, ^o $p < 0,05$; **, [□] $p < 0,01$)

1.5. Efekat *iTBS* i *kTBS* na ekspresiju *GFAP* u moždanim strukturama *Wistar* pacova

Ekspresija *GFAP* u moždanim strukturama kod placebo i stimuliranih (*iTBS*, *kTBS*) grupa prikazana je za motornu koru na slici V 1.5. a, strijatum na slici V 1.5. b, hipokampus na slici V 1.5. c i mali mozak na slici V 1.5. d.

U motornoj kori mladih životinja (slika V 1.5. a), nakon višekratne primene oba protokola registruje se manji intenzitet fluorescence *GFAP* u odnosu na jednokratnu primenu *TBS*. Kod adulta, manja ekspresija *GFAP* se beleži kod višekratne primene *iTBS* u poređenju sa jednokratnom primenom *iTBS* ($p < 0,05$). Poređenjem efekata višekratne primene oba protokola *TBS* kod mladih životinja u odnosu na višekratno tretirane adulte, u motornoj kori se beleži manja ekspresija *GFAP* u grupi mladih (*iTBS* $p < 0,05$; *kTBS* $p < 0,01$).

U strijatumu adultnih pacova (slika V 1.5. b), jednokratna primena *kTBS* smanjuje ekspresiju *GFAP* u odnosu na placebo. Višekratna u odnosu na pojedinačnu *iTBS* smanjuje intenzitet fluorescence *GFAP* kod mladih životinja ($p < 0,001$). Poređenjem efekata višekratne *iTBS* kod mladih u odnosu na adulte, u strijatumu mladih životinja registruje se manja ekspresija *GFAP* ($p < 0,001$).

U hipokampusu (slika V 1.5. c) mladih životinja jednokratna primena oba protokola smanjuje ($p < 0,05$), dok višekratna stimulacija istim protokolima kod adulta povećava ekspresiju *GFAP* u odnosu na placebo grupe. Kod mladih životinja, višekratno tretiranih *iTBS*, u hipokampusu se registruje manja ekspresija *GFAP* u odnosu na jednokratno tretirane ($p < 0,05$). Suprotno, u hipokampusu adulta višekratno stimuliranih istim protokolom beleži se veća ekspresija *GFAP* u poređenju sa jednokratnom stimulacijom ($p < 0,001$). Poređenjem efekata mladih u odnosu na adulte, jednokratna primena *iTBS* povećava ekspresiju *GFAP* proteina u ovoj moždanoj strukturi ($p < 0,05$), a višekratna je smanjuje ($p < 0,01$).

Jednokratna primena oba *TBS* protokola u malom mozgu (slika V 1.5. d) mladih životinja smanjuje ekspresiju *GFAP* u odnosu na placebo (oba $p < 0,01$). Kod adulta, i jednokratna i višekratna primena *iTBS* povećavaju ekspresiju *GFAP* u poređenju sa placebo grupama. Kod mladih životinja, višekratna primena oba *TBS* protokola smanjuje ekspresiju *GFAP* (*iTBS* $p < 0,01$; *kTBS* $p < 0,001$) u odnosu na jednokratno tretirane životinje. Kod adulta se ovakav efekat (smanjena ekspresija *GFAP* nakon višekratne aplikacije u odnosu na jednokratnu), registruje kod primene *iTBS* ($p < 0,001$). Poređenjem efekata višekratne stimulacije kod mladih u odnosu na adultne životinje, registruje se značajno manja ekspresija

1.6. Korelativna analiza između imunohistohemijskih parametara u selektivno osjetljivim strukturama mozga nakon primene *TBS*

Tabela 1. Korelacija između imunohistohemijskih parametara u selektivno osjetljivim strukturama mozga nakon primene *TBS*

protokol	Parovi varijabli	R	p
i <i>TBS</i>	Ja/GLAST/MK vs. Ja/GFAP/MK	0.980	0,020*
	Ja/vGluT-1/MK vs. Jm/vGluT-1/MK	0.989	0,011*
	Ja/GFAP/H vs. Va/GFAP/H	-0.689	0,040*
	Va/vGluT-1/MM vs. Va/vGluT-1/S	0.985	0,040*
	Va/GLT-1/S vs. Va/GLT-1/MK	-1.000	0,011*
	Va/GFAP/MM vs. Va/GFAP/S	0.758	0,004**
	Va/GFAP/MM vs. Va/GFAP/H	0.794	0,002**
	Va/GLAST/MK vs. Vm/GLAST/MK	0.998	0,042*
k <i>TBS</i>	Ja/vGluT-1/MK vs. Ja/vGluT-1/S	0.903	0,036*
	Ja/BDNF/H vs. Ja/BDNF/S	0.880	0,017*
	Ja/GFAP/MM vs. Ja/vGluT-1/MM	-0.948	0,014*
	Ja/GFAP/MK vs. Ja/GLT-1/MK	0.955	0,003**
	Jm/GLT-1/MM vs. Jm/GLT-1/H	-0.995	0,001***
	Jm/GFAP/MM vs. Jm/GFAP/S	0.663	0,025*
	Va/GLT-1/MM vs. Va/GLT-1/H	-0.985	0,036*
	Va/GFAP/MK vs. Va/GLT-1/MK	-0.998	0,038*
	Va/GLAST/MK vs. Va/GFAP/MK	-0.999	0,029*
	Vm/vGluT-1/MK vs. Jm/vGluT-1/MK	-0.967	0,033*
	Vm/GFAP/S vs. Vm/GFAP/MK	-0.624	0,040*
	Vm/GFAP/H vs. Vm/GFAP/S	-0.826	0,002**

Jm/Vm- jednokratni/ višekratni tretman kod mladih životinja; Ja/Va- jednokratni/ višekratni tretman kod adultnih životinja; v*GluT-1*-vezikularni glutamatni transporter 1, *GLAST*-transporter ekscitatornih amino-kiselina 1; *GLT-1*-transporter ekscitatornih amino-kiselina 2, *GFAP*-glijalni fibrilarni kiseli protein; *BDNF*-neurotrofični faktor moždanog porekla; MK- motorna kora; S- strijatum; H- hipokampus; MM- mali mozak; i*TBS*- intermitentna stimulacija teta praskovima; k*TBS*- kontinuirana stimulacija teta praskovima; R- Spearman-ov korelacioni koeficijent; statistička značajnost je određena za $p < 0,05$

V 2. Efekat *iTBS* i *kTBS* na promene ispitivanih biohemijskih parametara u moždanim strukturama *Wistar* pacova

2.1. Efekat *iTBS* i *kTBS* na koncentraciju *TBARS* u moždanim strukturama *Wistar* pacova

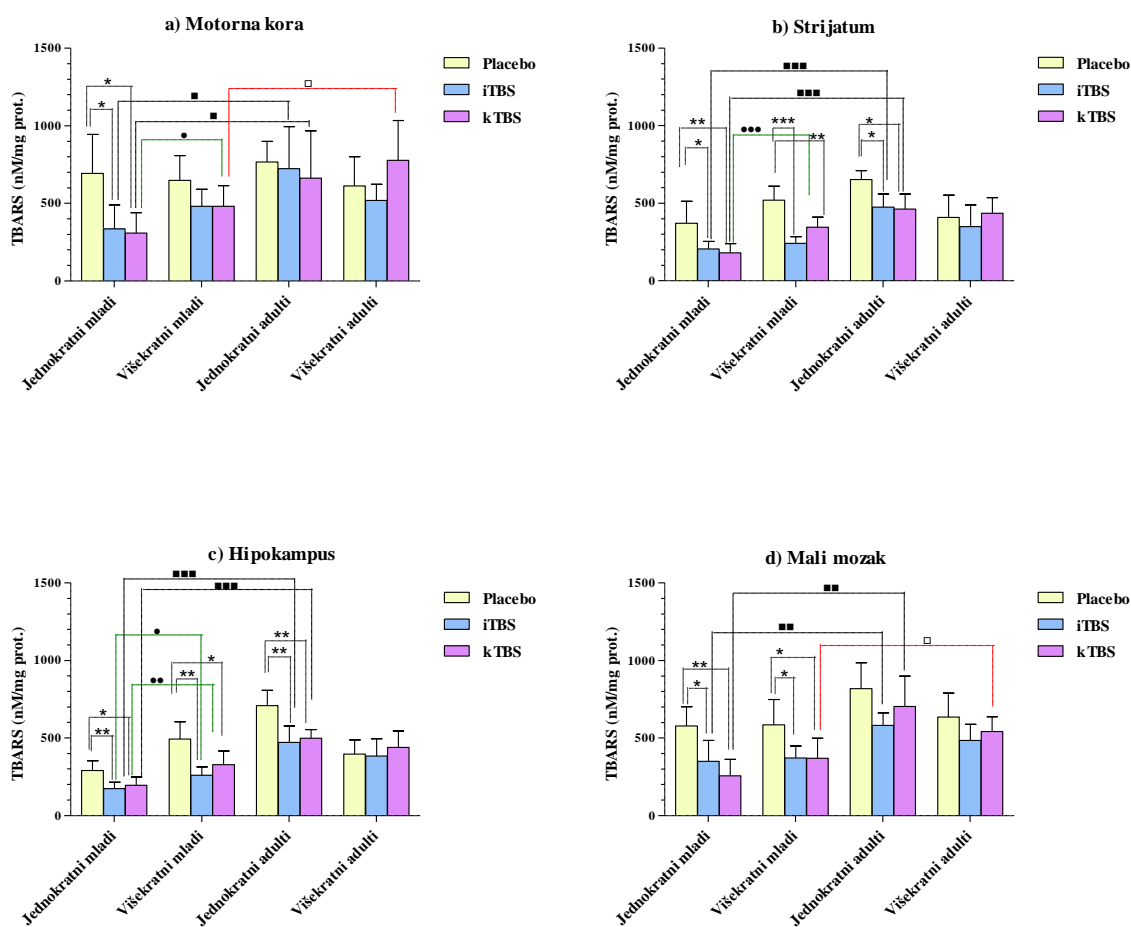
Koncentracija *TBARS* u moždanim regionima kod placebo i eksperimentalnih (*iTBS*, *kTBS*) grupa predstavljena je za motornu koru na slici V 2.1. a, strijatum na slici V 2.1. b, hipokampus na slici V 2.1. c i mali mozak na slici V 2.1. d.

U motornoj kori (slika V 2.1. a) beleži se smanjenje koncentracije *TBARS* u grupi mladih životinja jednokratno tretiranih sa oba protokola u poređenju sa placebo grupom ($p < 0,05$). Kod mladih životinja nakon višekratne primene *kTBS*, registruje se veća koncentracija *TBARS* u poređenju sa jednokratnom primenom *kTBS* ($p < 0,05$). Poređenjem mladih u odnosu na adulte, nakon pojedinačne primene oba protokola (*iTBS*, *kTBS*), kao i nakon višekratne *kTBS*, registruje se manja koncentracija *TBARS* kod mladih životinja ($p < 0,05$).

U strijatumu (slika V 2.1. b) primena oba protokola u grupama jednokratno i višekratno tretiranih mladih životinja, kao i jednokratno tretiranih adulta dovodi do smanjenja koncentracije *TBARS* u poređenju sa placebo grupama. Nakon višekratne stimulacije *kTBS* kod mladih životinja dolazi do povećanja *TBARS* u odnosu na jednokratno tretiranu grupu ($p < 0,001$). Takođe, nakon jednokratne primene oba protokola (*iTBS*, *kTBS*) manja je koncentracija *TBARS* kod mladih u odnosu na adultne životinje ($p < 0,001$).

Jednokratna i višekratna stimulacija *iTBS* i *kTBS* u hipokampusu mladih pacova, kao i jednokratna stimulacija adulta (*iTBS*, *kTBS*) snižava koncentraciju *TBARS* u poređenju sa placebo grupama (slika V 2.1. c). Kod mladih životinja, koncentracija *TBARS* je veća nakon višekratne primene oba protokola u odnosu na jednokratno tretirane grupe. Jednokratnom primenom oba protokola kod mladih životinja u odnosu na adulte indukovano je smanjenje koncentraciju *TBARS* (oba $p < 0,001$).

U malom mozgu mladih životinja oba protokola i jednokratne i višekratne stimulacije smanjuju koncentraciju *TBARS* u poređenju sa placebo grupama (slika V 2.1. d). *TBARS* su sniženi kod mladih životinja nakon jednokratne primene oba protokola u odnosu na jednokratnu stimulaciju u grupi adultnih životinja (oba $p < 0,01$). Višekratna *kTBS* smanjuje ($p < 0,05$) koncentraciju *TBARS* u regionu malog mozga mladih pacova u odnosu na adulte.



Slika V 2.1. Koncentracija tiobarbiturna kiselina- reagujućih supstanci (TBARS) u a) motornoj kori, b) strijatumu, c) hipokampusu i d) malom mozgu mladih i adultnih Wistar pacova u placebo grupi i nakon intermitentne i kontinuirane stimulacije teta praskovima (iTBS, kTBS).

Vrednosti su izražene u nM/mg prot. kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku stimulisanih životinja u odnosu na placebo pacove (*), višekratno stimulisane u odnosu na jednokratno stimulisane mlade životinje (*), jednokratno stimulisane mlade u poređenju sa jednokratno stimulisanim adultnim životinjama (•) i višekratno stimulisane mlade u poređenju sa višekratno stimulisanim adultnim životinjama (◻). (*, •, ◻, p<0,05; **, ••, ◻◻, p<0,01; ***, •••, ◻◻◻, p<0,001)

2.2. Efekat *iTBS* i *kTBS* na proizvodnju $O_2^{\cdot-}$ u moždanim strukturama *Wistar* pacova

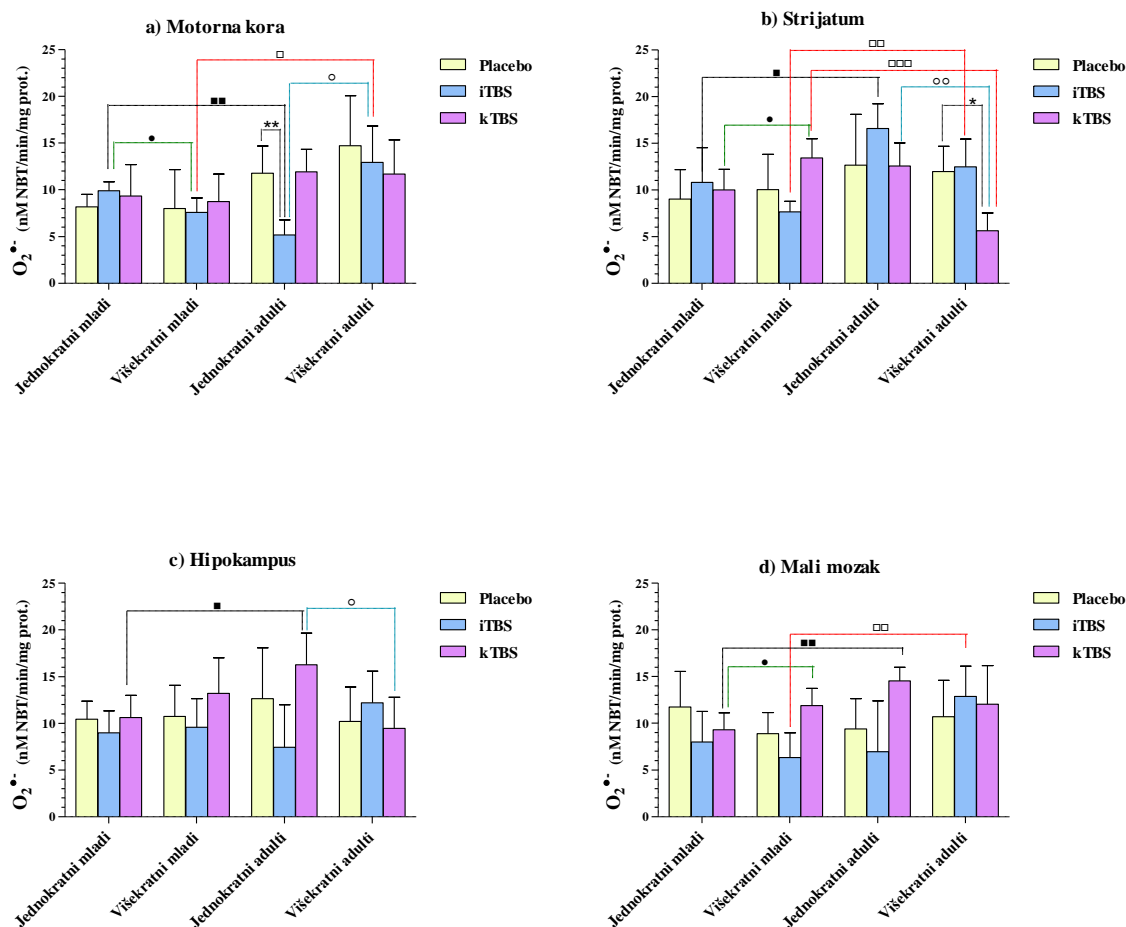
Proizvodnja $O_2^{\cdot-}$ u moždanim regionima kod placebo i eksperimentalnih (*iTBS*, *kTBS*) grupa predstavljena je za motornu koru na slici V 2.2. a, strijatum na slici V 2.2. b, hipokampus na slici V 2.2. c i mali mozak na slici V 2.2. d.

U motornoj kori (slika V 2.2. a) smanjuje se koncentracije $O_2^{\cdot-}$ u grupi adultnih životinja jednokratno tretiranih *iTBS* protokolom u poređenju sa placebo grupom ($p < 0,01$). Višekratna primena *iTBS* dovodi do manje produkcije $O_2^{\cdot-}$ u poređenju sa jednokratnom stimulacijom kod mladih životinja ($p < 0,05$). Suprotno ovome, višekratna primena istog protokola kod adulta dovodi do većeg stvaranja superoksida u odnosu na jednokratnu primenu *iTBS* ($p < 0,05$). Poređenjem mladih i adultnih životinja koje su tretirane jednokratno *iTBS*om nalazi se veće stvaranje $O_2^{\cdot-}$ kod mladih životinja ($p < 0,01$), dok je stvaranje superoksida izraženije kod višekratno tretiranih adulta u odnosu na mlade životinje ($p < 0,05$).

U strijatumu (slika V 2.2. b) višekratno tretiranih adultnih životinja *kTBS* protokolom registruje se smanjenje proizvodnje $O_2^{\cdot-}$ u poređenju sa placebo grupom ($p < 0,05$). Nakon višekratne stimulacije *kTBS* kod mladih nalazi se veća produkcija $O_2^{\cdot-}$ u odnosu na jednokratno tretiranu grupu ($p < 0,05$), dok je u grupi adulta višekratno stimuliranih istim protokolom zabeležena manja produkcija u odnosu na jednokratno tretiranu grupu ($p < 0,01$). Jednokratna primena *iTBS* kod mladih životinja dovodi do manjeg stvaranja $O_2^{\cdot-}$ u poređenju sa adultima ($p < 0,01$). Kod mladih u odnosu na adultne životinje višekratni tretman *iTBS* smanjuje ($p < 0,001$), dok *kTBS* povećava stvaranje $O_2^{\cdot-}$ ($p < 0,01$).

Višekratna *kTBS* kod adultnih pacova dovodi do smanjena $O_2^{\cdot-}$ produkcije u hipokampusu u poređenju sa jednokratno tretiranom grupom (slika V 2.2. c). Kod jednokratno tretiranih mladih *kTBS*om u odnosu na adulte, nalazi se manje stvaranje $O_2^{\cdot-}$ ($p < 0,05$).

U malom mozgu produkcija $O_2^{\cdot-}$ kod višekratno tretiranih mladih životinja *kTBS* protokolom povećana je u poređenju sa jednokratno tretiranom grupom ($p < 0,05$). Nakon jednokratne *kTBS* kod mladih životinja manja je proizvodnja $O_2^{\cdot-}$ u odnosu na jednokratno tretirane adulte ($p < 0,01$), kao i višekratna *iTBS* kod mladih u poređenju sa adultnim pacovima (slika V 2.2. d).



Slika V 2.2. Stvaranje superoksidnog anjona ($O_2^{\bullet-}$) u a) motornoj kori, b) strijatumu, c) hipokampusu i d) malom mozgu mladih i adultnih *Wistar* pacova u placebo grupi i nakon intermitentne i kontinuirane stimulacije teta praskovima (*iTBS*, *kTBS*).

Vrednosti su izražene u nM NBT/min/mg prot. kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku stimulisanih životinja u odnosu na placebo pacove (*), višekratno stimulisane u odnosu na jednokratno stimulisane mlade životinje (•), višekratno stimulisane u odnosu na jednokratno stimulisane adultne životinje (°), jednokratno stimulisane mlade u poređenju sa jednokratno stimulisanim adultnim životinjama (◊) i višekratno stimulisane mlade u poređenju sa višekratno stimulisanim adultnim životinjama (◻). (*, •, °, ◊, ◻, p<0,05; **, °°, ◻◻, p<0,01; ◻◻◻ p<0,001)

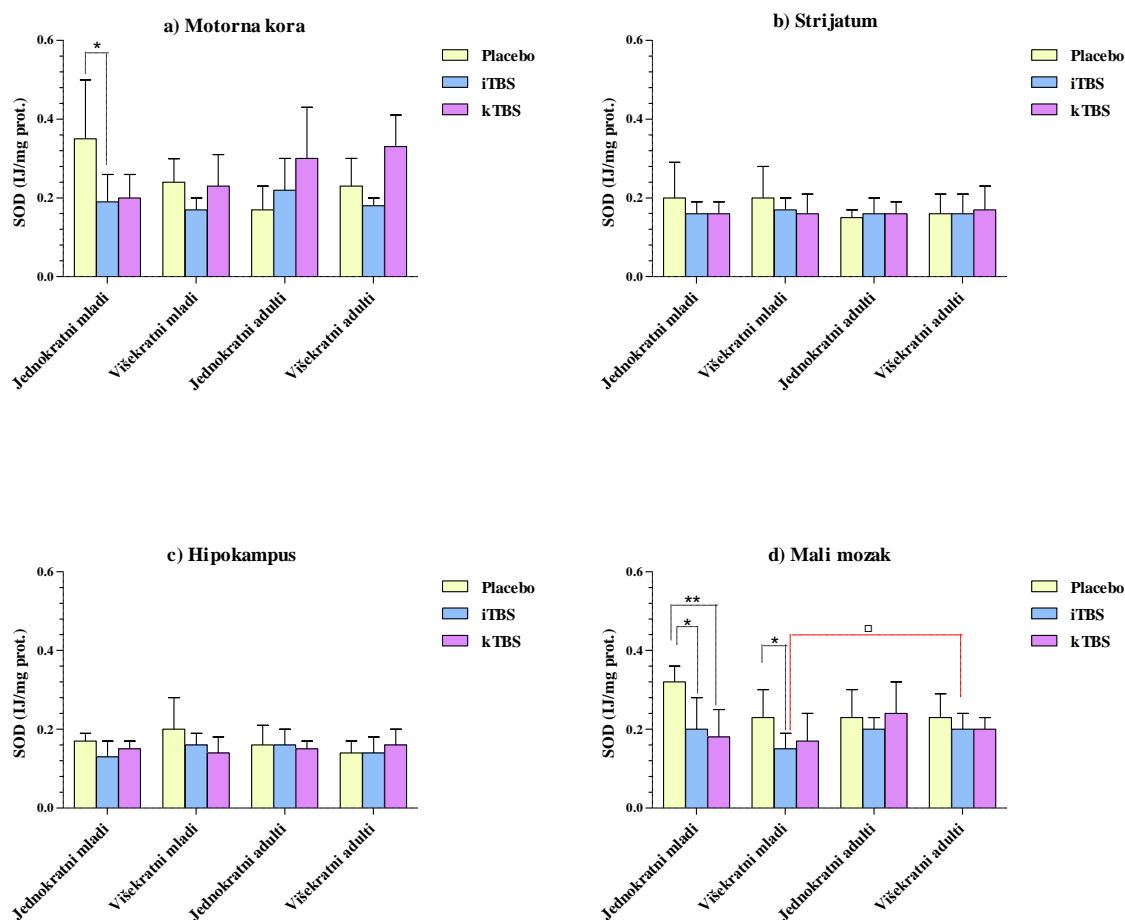
2.3. Efekat *iTBS* i *kTBS* na aktivnost ukupne SOD u moždanim strukturama *Wistar* pacova

Aktivnost SOD u moždanim regionima kod placebo i eksperimentalnih (*iTBS*, *kTBS*) grupa predstavljena je za motornu koru na slici V 2.3. a, strijatum na slici V 2.3. b, hipokampus na slici V 2.3. c i mali mozak na slici V 2.3. d.

U motornoj kori (slika V 2.3. a) smanjuje se aktivnost SOD u grupi mladih životinja jednokratno tretiranih *iTBS* protokolom u poređenju sa placebo grupom ($p < 0,05$).

U strijatumu (slika V 2.3. b) i hipokampusu (slika V 2.3. c) nisu zabeležene promene u aktivnosti SOD.

U malom mozgu (slika V 2.3. d) aktivnost SOD je snižena nakon jednokratne primene oba protokola, kao i nakon višekratne primene *iTBS* kod mladih životinja u poređenju sa placebo grupama. Višekratna *iTBS* kod mladih životinja snižava aktivnost SOD u odnosu na višekratno stimulisane adulte ($p < 0,05$).



Slika V 2.3. Aktivnost ukupne superoksid dizmutaze (SOD) u a) motornoj kori, b) strijatumu, c) hipokampusu i d) malom mozgu mladih i adultnih *Wistar* pacova u placebo grupi i nakon intermitentne i kontinuirane stimulacije teta praskovima (*iTBS*, *kTBS*).

Vrednosti su izražene u IU/mg prot. kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku stimulisanih životinja u odnosu na placebo pacove (*) i višekratno stimulisane mlade u poređenju sa višekratno stimulisanim adultnim životinjama (□). (*, □ $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

2.4. Efekat *iTBS* i *kTBS* na sadržaj SH u moždanim strukturama *Wistar* pacova

Koncentracija SH u moždanim regionima kod placebo i eksperimentalnih (*iTBS*, *kTBS*) grupa je predstavljena za motornu koru na slici V 2.4. a, strijatum na slici V 2.4. b, hipokampus na slici V 2.4. c i mali mozak na slici V 2.4. d.

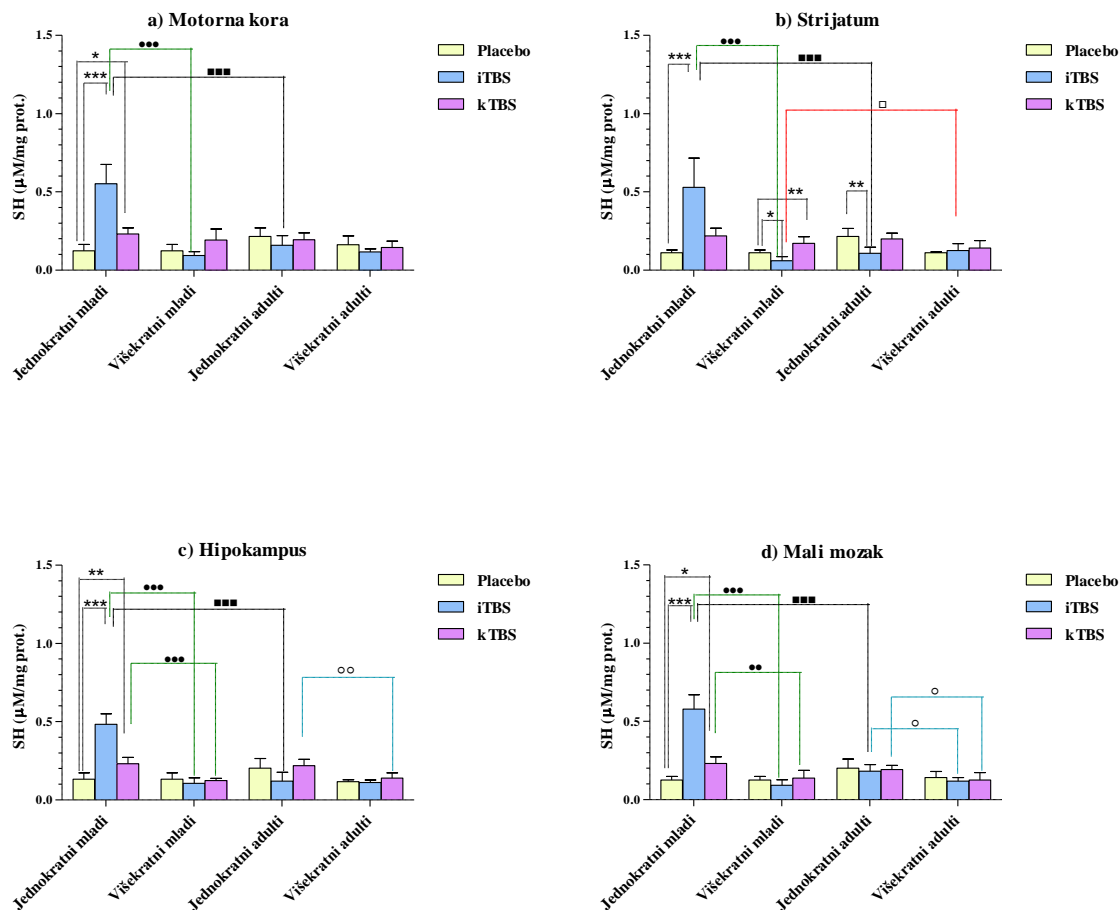
U motornoj kori (slika V 2.4. a) beleži se povećanje koncentracije SH nakon jednokratne primene oba protokola u grupama mladih životinja u poređenju sa placebo grupom. Višekratna primena *iTBS* dovodi do smanjenja količine SH u poređenju sa jednokratnom primenom kod mladih životinja ($p < 0,001$). Nakon protokola *iTBS* primenjenog jednokratno kod mladih životinja nalazi se veći SH u poređenju sa adultima ($p < 0,001$).

U strijatumu (slika V 2.4. b) mladih životinja nakon jednokratne primene *iTBS* beleži se značajno povećanje SH u poređenju sa placebo grupom ($p < 0,001$). U grupi mladih životinja višekratna *iTBS* smanjuje ($p < 0,05$), dok *kTBS* protokol povećava ($p < 0,01$) koncentraciju SH u poređenju sa placebo grupom. Jednokratni protokol *iTBS* kod adulta smanjuje SH u poređenju sa placebo grupom ($p < 0,01$). Nakon višekratne primene *iTBS* kod mladih životinja dolazi do znatnog smanjenja koncentracije SH u poređenju sa jednokratnom primenom istog protokola ($p < 0,001$). Jednokratna primena protokola *iTBS* povećava ($p < 0,001$), dok višekratna primena istog protokola snižava SH ($p < 0,05$) kod mladih u odnosu na adultne životinje.

Jednokratna stimulacija *iTBS* i *kTBS* u hipokampusu mladih pacova povećava koncentraciju SH u poređenju sa placebo grupom (slika V 2.4. c). Koncentracija SH je niža ($p < 0,001$) nakon višekratne primene oba protokola kod mladih u odnosu na jednokratno tretirane životinje. Nakon višekratne primene *kTBS* u adulta registruje se niža koncentracija SH u hipokampusu, u poređenju sa jednokratno tretiranim životinjama ($p < 0,01$). U grupi jednokratno tretiranih mladih životinja *iTBS* protokolom beleži se značajno povećanje ($p < 0,001$) koncentracije SH u odnosu na adulte.

U malom mozgu mladih životinja oba protokola jednokratne stimulacije povećavaju koncentraciju SH (slika V 2.4. d) u poređenju sa placebo grupom. Koncentracija SH je i kod mladih i kod adultnih životinja nakon višekratne primene oba protokola (*iTBS*, *kTBS*) manja u odnosu na jednokratno stimulisane grupe. U malom mozgu adultnih pacova jednokratna stimulacija *iTBS* i *kTBS* povećava koncentraciju SH u poređenju sa višekratno tretiranim

životinjama (oba $p < 0,05$). Nakon jednokratne *iTBS*, nalazi se veća koncentracija SH u regionu malog mozga mladih pacova u odnosu na adultne životinje ($p < 0,001$).



Slika V 2.4. Sadržaj ukupnih sulfhidrilnih grupa (SH) u a) motornoj kori, b) strijatumu, c) hipokampusu i d) malom mozgu mladih i adultnih *Wistar* pacova u placebo grupi i nakon intermitentne i kontinuirane stimulacije teta praskovima (*iTBS*, *kTBS*).

Vrednosti su izražene u $\mu\text{M}/\text{mg prot.}$ kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku stimuliranih životinja u odnosu na placebo pacove (*), višekratno stimulirane u odnosu na jednokratno stimulirane mlade životinje (\bullet), višekratno stimulirane u odnosu na jednokratno stimulirane adultne životinje (\circ), jednokratno stimulirane mlade u poređenju sa jednokratno stimuliranim adultnim životinjama ($\dot{\bullet}$) i višekratno stimulirane mlade u poređenju sa višekratno stimuliranim adultnim životinjama (\square). (*, \circ , $\dot{\bullet}$, \square , $p < 0,05$; **, $\circ\circ$, $p < 0,01$; ***, $\bullet\bullet\bullet$, $\square\square$, $p < 0,001$)

2.5. Efekat *iTBS* i *kTBS* na koncentracija GSH u moždanim strukturama *Wistar* pacova

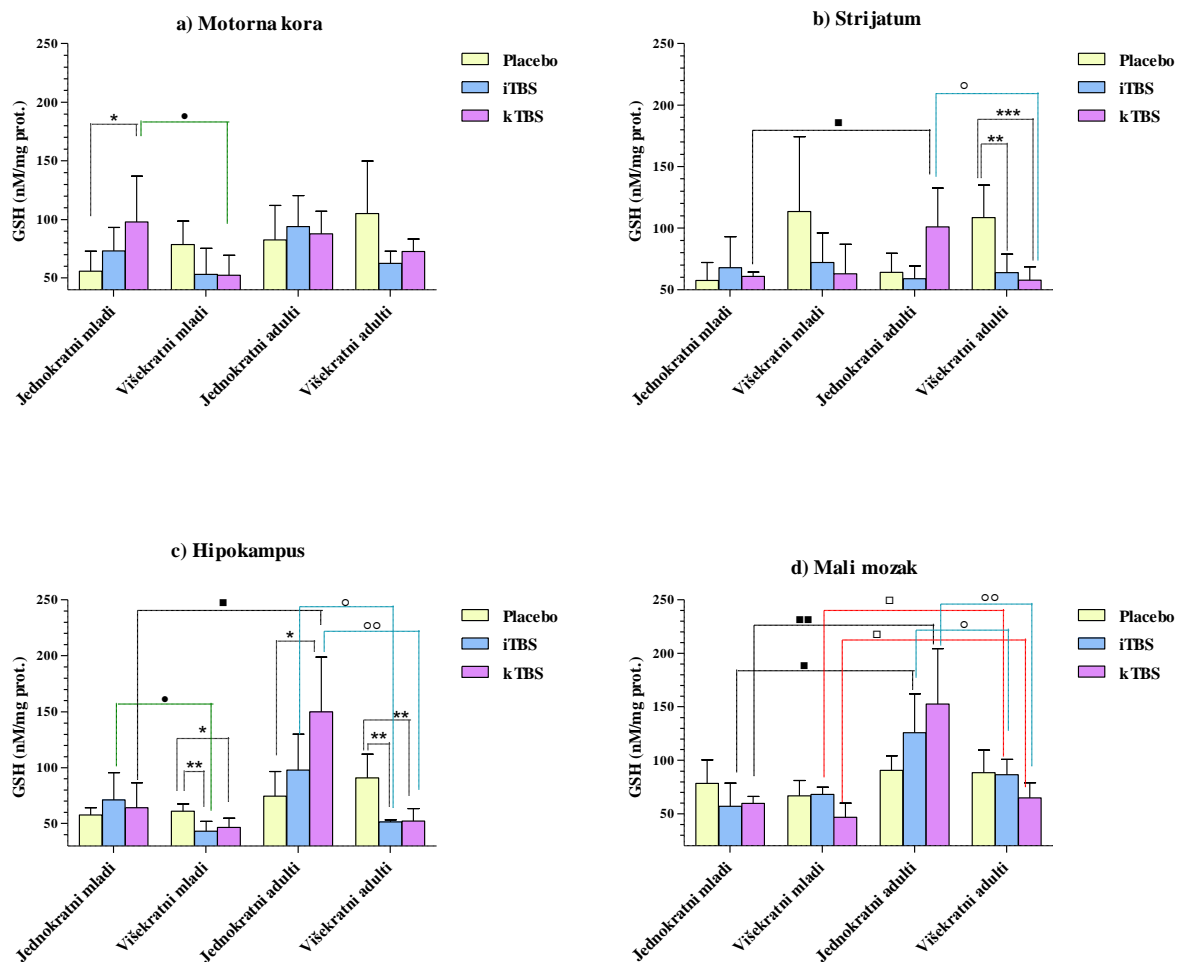
Rezultati promene koncentracija GSH u moždanim regionima kod placebo i eksperimentalnih (*iTBS*, *kTBS*) grupa su predstavljeni za motornu koru na slici V 2.5. a, strijatum na slici V 2.5 b, hipokampus na slici V 2.5 c i mali mozak na slici V 2.5 d.

U motornoj kori (slika V 2.5. a) mladih životinja beleži se povećanje koncentracije GSH nakon jednokratne *kTBS* u poređenju sa placebo grupom ($p < 0,05$), dok se nakon višekratne primene *kTBS* smanjuje u odnosu na jednokratnu stimulaciju ($p < 0,05$).

U strijatumu (slika V 2.5. b) adultnih životinja nakon višekratne primene oba *TBS* protokola uočava se značajno niži GSH u poređenju sa placebo grupom. U grupi adultnih životinja višekratno tretiranih *kTBS* beleži se manja koncentracija GSH u poređenju sa jednokratno tretiranom grupom ($p < 0,05$). Nakon jednokratne *iTBS* kod mladih životinja registrovana je manja koncentracija GSH u strijatumu, u poređenju sa jednokratno stimulisanim adultima ($p < 0,05$).

Višekratna stimulacija *iTBS* i *kTBS* u hipokampusu (slika V 2.5. c) mladih i adultnih pacova snižava koncentraciju GSH, dok jednokratna *kTBS* u grupi adulta povećava ovaj tripeptid u poređenju sa placebo grupom ($p < 0,05$). Nakon višekratne *iTBS* kod mladih, kao i nakon aplikacije oba protokola (*iTBS*, *kTBS*) kod adultnih pacova registruje se niži GSH u poređenju sa jednokratnim tretmanom. Poređenjem jednokratno tretiranih mladih životinja i adulta *kTBS*om, u hipokampusu se beleži manja koncentracija GSH u odnosu na adulte ($p < 0,05$).

U malom mozgu (slika V 2.5. d) adultnih životinja, oba protokola višekratne stimulacije snižavaju koncentraciju GSH u poređenju sa jednokratno tretiranim grupama. Koncentracija GSH kod mladih životinja nakon jednokratne i višekratne primene oba protokola (*iTBS*, *kTBS*) je smanjena u odnosu na jednokratno, odnosno višekratno stimulisane adultne grupe.



Slika V 2.5. Koncentracija redukovanog glutationa (GSH) u a) motornoj kori, b) strijatumu, c) hipokampusu i d) malom mozgu mladih i adultnih *Wistar* pacova u placebo grupi i nakon intermitentne i kontinuirane stimulacije teta praskovima (*iTBS*, *kTBS*).

Vrednosti su izražene u nM/mg prot. kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku stimulisanih životinja u odnosu na placebo pacove (*), višekratno stimulisane u odnosu na jednokratno stimulisane mlade životinje (°), višekratno stimulisane u odnosu na jednokratno stimulisane adultne životinje (°°), jednokratno stimulisane mlade u poređenju sa jednokratno stimulisanim adultnim životinjama (□) i višekratno stimulisane mlade u poređenju sa višekratno stimulisanim adultnim životinjama (□). (*, °, °°, □, **, °°, **) p<0,05; **, °°, ** p<0,01; *** p<0,001)

2.6. Efekat *iTBS* i *kTBS* na aktivnost GR u moždanim strukturama *Wistar* pacova

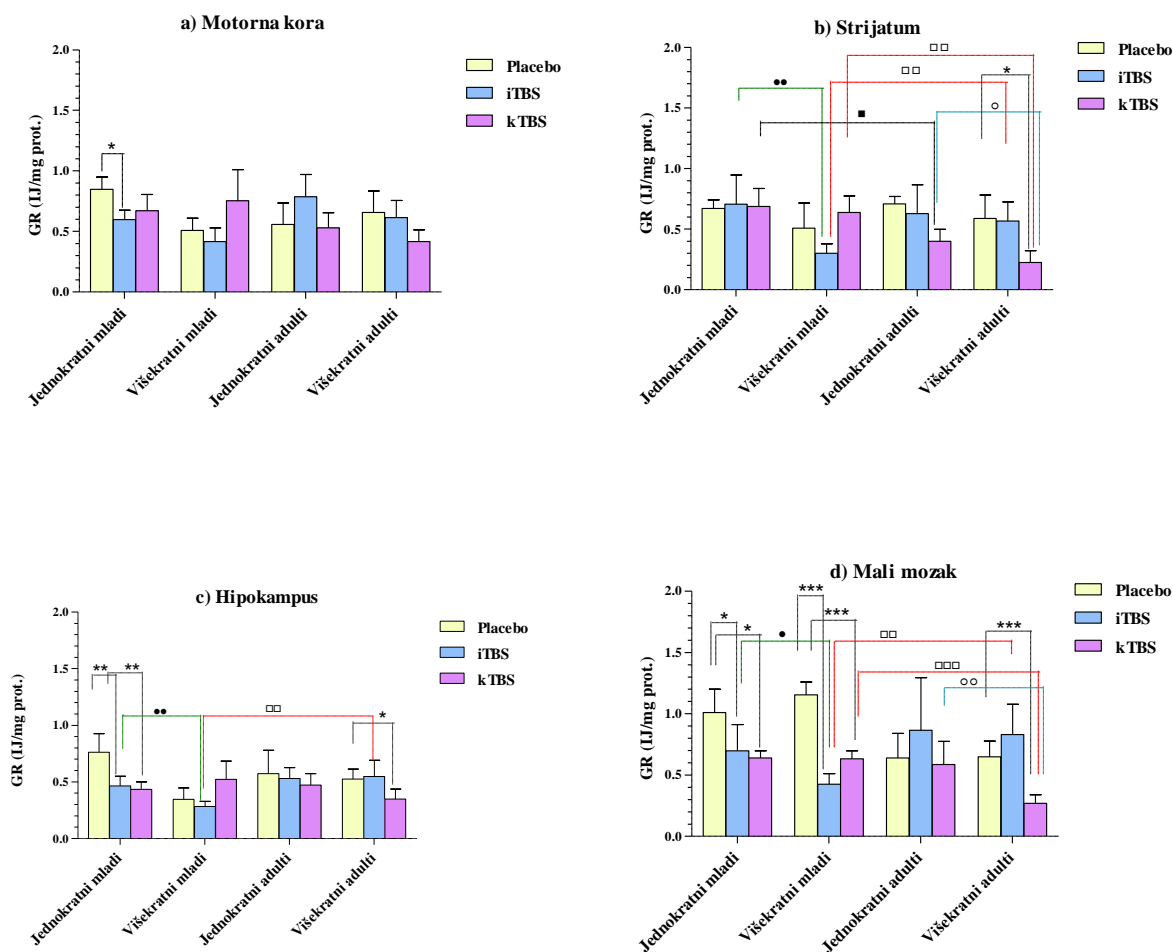
Rezultati aktivnosti GR u moždanim regionima kod placebo i eksperimentalnih (*iTBS*, *kTBS*) grupa su predstavljeni za motornu koru na slici V 2.6. a, strijatum na slici V 2.6. b, hipokampus na slici V 2.6. c i mali mozak na slici V 2.6. d.

U motornoj kori (slika V 2.6. a) je registrovano smanjenje aktivnosti GR u grupi mladih životinja jednokratno stimulisanih *iTBS* u poređenju sa placebo grupom ($p < 0,05$).

U strijatumu (slika V 2.6. b) nakon višekratne stimulacije *kTBS* kod adultnih životinja dolazi do smanjenja aktivnosti GR u odnosu na placebo grupu ($p < 0,05$). Smanjenje aktivnosti enzima registrovano je nakon višekratne u odnosu na jednokratnu *iTBS* kod mladih ($p < 0,01$), i *kTBS* kod adultnih životinja ($p < 0,05$). Nakon jednokratne *kTBS* kod mladih životinja registruje se veća GR u poređenju sa adultima ($p < 0,05$). Višekratna primena *iTBS* protokola izaziva manju aktivnost GR kod mladih u odnosu na adulte, dok se primenom *kTBS* beleži veća aktivnost GR kod mladih u odnosu na adulte ($p < 0,01$).

U poređenju sa placebo grupom, jednokratnom *iTBS* i *kTBS* u hipokampusu (slika V 2.6. c) mladih pacova nastaje smanjena aktivnost GR (oba $p < 0,01$), što je nalaz nakon višekratne *kTBS* kod adulta ($p < 0,05$). Aktivnost enzima je smanjena nakon višekratne *iTBS* u odnosu na jednokratnu *iTBS* kod mladih životinja ($p < 0,01$). Nakon višekratne *iTBS* beleži se manja aktivnost GR kod mladih u poređenju sa adultnim životinjama ($p < 0,01$).

U odnosu na placebo grupu, u malom mozgu (slika V 2.6. d) mladih životinja, oba protokola jednokratne i višekratne *TBS* smanjuju aktivnost GR. Ovo je nalaz i nakon višekratne primene *kTBS* kod adulta ($p < 0,001$). Aktivnost GR je snižena nakon višekratne u odnosu na jednokratnu *iTBS* u grupi mladih životinja ($p < 0,05$), kao i kod višekratne u odnosu na jednokratnu *kTBS* u grupi adultnih životinja ($p < 0,01$). Višekratna *iTBS* smanjuje ($p < 0,01$), dok *kTBS* povećava ($p < 0,001$) aktivnost GRu regionu malog mozga mladih pacova u odnosu na adulte.



Slika V 2.6. Aktivnost glutation redukataze (GR) u a) motornoj kori, b) strijatumu, c) hipokampusu i d) malom mozgu mladih i adultnih *Wistar* pacova u placebo grupi i nakon intermitentne i kontinuirane stimulacije teta praskovima (*iTBS*, *kTBS*).

Vrednosti su izražene u IJ/mg prot. kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku stimulisanih životinja u odnosu na placebo pacove (*), višekratno stimulisane u odnosu na jednokratno stimulisane mlade životinje (•), višekratno stimulisane u odnosu na jednokratno stimulisane adultne životinje (°), jednokratno stimulisane mlade u poređenju sa jednokratno stimulisanim adultnim životinjama (ˆ) i višekratno stimulisane mlade u poređenju sa višekratno stimulisanim adultnim životinjama (◻). (*, •, °, ˆ, ◻, p<0,05; **, **, ◻◻, ◻◻◻ p<0,01; ***, ◻◻◻◻ p<0,001)

2.7. Efekat *iTBS* i *kTBS* na aktivnost GST u moždanim strukturama *Wistar* pacova

Rezultati aktivnosti GST u moždanim regionima kod placebo i eksperimentalnih (*iTBS*, *kTBS*) grupa su predstavljeni za motornu koru na slici V 2.7. a, strijatumu na slici V 2.7. b, hipokampusu na slici V 2.7. c i mali mozak na slici V 2.7. d.

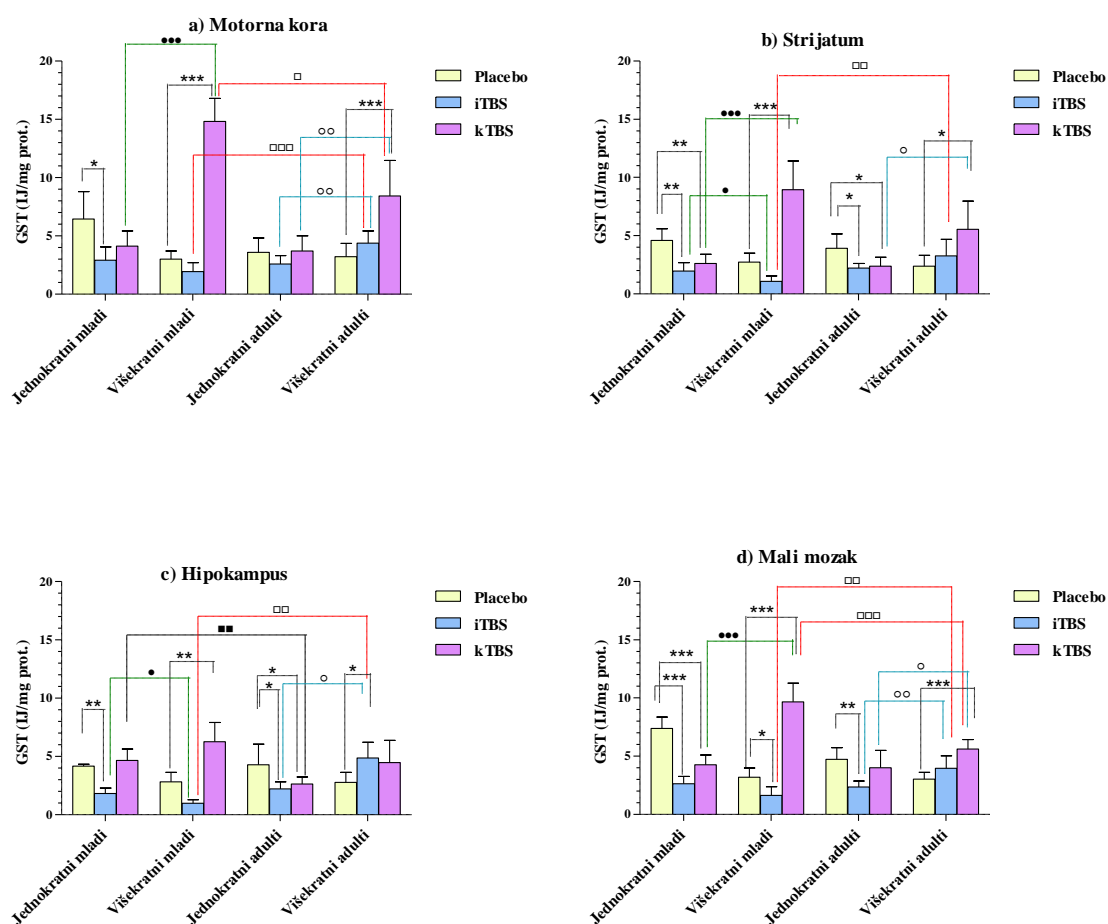
U poređenju sa placebo grupama, u motornoj kori (slika V 2.7. a) je registrovano smanjenje aktivnosti GST u grupi mladih životinja jednokratno stimuliranih *iTBS* ($p < 0,05$), dok se značajno povećanje aktivnosti beleži nakon višekratnog *kTBS* u grupama mladih i adultnih životinja (oba $p < 0,001$). Višestruko povećanje aktivnosti GST je registrovano nakon višekratne *kTBS* u grupi mladih, kao i nakon višekratne primene oba protokola u adultnim grupama i u poređenju sa jednokratno tretiranim životinjama. Kod mladih životinja višekratna primena *iTBS* dovodi do opadanja aktivnosti GST, dok višekratna *kTBS* povećava aktivnost enzima u poređenju sa višekratno tretiranim adultima.

U strijatumu mladih i adultnih životinja (slika V 2.7. b), nakon jednokratne stimulacije oba protokola (*iTBS*, *kTBS*) dovode do smanjenja aktivnosti GST, dok je višekratna primena *kTBS* kod mladih i adulta dovela do povećanja aktivnosti enzima u odnosu na odgovarajuće placebo grupe. Smanjenje aktivnosti enzima registrovano je nakon višekratne u odnosu na jednokratnu *iTBS* kod mladih ($p < 0,05$), dok je nakon višekratne *kTBS* kod mladih i adultnih životinja došlo do povećanja aktivnosti u poređenju sa jednokratno tretiranim grupama. Nakon višekratne *iTBS*, u strijatumu mladih životinja nalazi se manja aktivnost GST u poređenju sa adultima ($p < 0,01$).

U odnosu na placebo grupe, jednokratna stimulacija *iTBS* kod mladih pacova smanjuje GST u hipokampusu (slika V 2.7. c), što se nalazi i nakon primene oba jednokratna *TBS* protokola u grupi adulta. Obrnuto, višekratna primena *kTBS* kod mladih i primena *iTBS* kod adulta povećavaju aktivnost GST u hipokampusu u poređenju sa placebo grupama. Aktivnost enzima je smanjena nakon višekratne u odnosu na jednokratnu *iTBS* kod mladih životinja ($p < 0,05$), a povećana kod adultnih pacova ($p < 0,05$). Poređenjem promena kod mladih u odnosu na adulte nakon jednokratne *kTBS* nalazi se veća aktivnost GST u hipokampusu mladih životinja ($p < 0,01$), dok višekratna *iTBS* smanjuje njenu aktivnost u grupi mladih životinja u odnosu na adulte ($p < 0,01$).

U poređenju sa placebo grupom, nakon jednokratne primene oba protokola (*iTBS*, *kTBS*) u regionu malog mozga mladih životinja (slika V 2.7. d) beleži se smanjena aktivnost

GST, a smanjenje se nalazi i kod višekratnog tretmana *iTBS*om ($p < 0,05$). Suprotno, višekratna primena *kTBS* kod mladih životinja značajno povećava aktivnost GST u odnosu na placebo grupu ($p < 0,001$). U grupi adulta, nakon primene jednokratne *iTBS* beleži se smanjenje aktivnosti GST ($p < 0,01$), dok višekratna primena *kTBS* dovodi do veće aktivnosti enzima u poređenju sa placebo grupom ($p < 0,001$). Višekratna *kTBS* kod mladih i višekratna stimulacija sa oba protokola *TBS* kod adultnih životinja dovodi do povećanja aktivnosti GST u poređenju sa jednokratno tretiranim grupama pacova. Poredeći mlade i adultne višekratno tretirane životinje, nalazi se da *iTBS* smanjuje ($p < 0,01$), dok *kTBS* povećava aktivnost GST ($p < 0,001$).



Slika V 2.7. Aktivnost glutation transferaze (GST) u a) motornoj kori, b) strijatumu, c) hipokampusu i d) malom mozgu mladih i adultnih *Wistar* pacova u placebo grupi i nakon intermitentne i kontinuirane stimulacije teta praskovima (*iTBS*, *kTBS*).

Vrednosti su izražene u IJ/mg prot. kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku stimulisanih životinja u odnosu na placebo pacove (*), višekratno stimulisane u odnosu na jednokratno stimulisane mlade životinje (*), višekratno stimulisane u odnosu na jednokratno stimulisane adultne životinje (\circ), jednokratno stimulisane mlade u poređenju sa jednokratno stimulisanim adultnim životinjama (\cdot) i višekratno stimulisane mlade u poređenju sa višekratno stimulisanim adultnim životinjama (\square). (*, \cdot , \circ , \square) p<0,05; **, $\circ\circ$, $\square\square$ p<0,01; ***, $\bullet\bullet\bullet$, $\square\square\square$ p<0,001)

2.8. Korelativna analiza između biohemijskih parametara u selektivno osjetljivim strukturama mozga nakon primene *TBS*

Tabela 2. Korelacija između biohemijskih parametara u selektivno osjetljivim strukturama mozga nakon primene *TBS*

protokol	Parovi varijabli	R	p
<i>iTBS</i>	Jm/SOD/S vs. Ja/SOD/S	-0.861	0,033*
	Va/SH/H vs. Va/SH/MM	0.975	0,017*
	Va/GSH/S vs. Va/GST/S	0.886	0,033*
<i>kTBS</i>	Ja/GST/MK vs. Jm/GST/MK	0.886	0,033*
	Ja/GST/S vs. Jm/GST/S	-0.899	0,033*
	Jm/O ₂ ^{•-} /S vs. Jm/O ₂ ^{•-} /MK	-0.943	0,017*
	Jm/SOD/MK vs. Ja/SOD/MK	0.928	0,017*
	Jm/GSH/MK vs. Jm/GST/MK	0.829	0,033*
	Va/O ₂ ^{•-} /MK vs. Va/O ₂ ^{•-} /H	0.886	0,033*
	Vm/SOD/H vs. Vm/SOD/MK	0.956	0,017*
	Vm/SOD/H vs. Jm/SOD/H	-0.939	0,017*
	Va/SH/MK vs. Vm/SH/MK	1.000	0,017*

Jm/Vm- jednokratni/ višekratni tretman kod mladih životinja; Ja/Va- jednokratni/ višekratni tretman kod adultnih životinja; O₂^{•-}- superoksidni anjon; SOD- superosid dizmutaza; SH- ukupne sulfhidrilne grupe; GSH- redukovani glutation; GST- glutation-S-transferaza; MK- motorna kora; S- strijatum; H- hipokampus; MM- mali mozak; *iTBS*- intermitentna stimulacija teta praskovima; *kTBS*- kontinuirana stimulacija teta praskovima; R- Spearman-ov korelacioni koeficijent; statistička značajnost je određena za p<0,05

VI DISKUSIJA

Uticaj TMS na povećano oslobađanje Glu i pokretanje niza aktivnosti čija je uloga njegovo uklanjanje iz sinaptičke pukotine, metabolička izmena same amino-kiseline i aktiviranje procesa sinaptičke plastičnosti kao posledice modulacije glutamatergičke transmisije je potvrđen u brojnim istraživanjima (Hoogendam i sar., 2010; Huang i sar., 2007; Pell i sar., 2011; Yue i sar., 2009).

Astroцити imaju brojne funkcije u CNS, između ostalih u regulaciji homeostaze neurotransmitera, energetsom metabolizmu, antioksidativnoj zaštiti i anti-inflamatornom odgovoru. Pored toga, astroцити su ključne ćelije u glutamatergičkoj transmisioj homeostazi. Oni preuzimaju glutamat preko visoko-afinitetnih glutamatnih transportera *GLT-1* i *GLAST*. Astroцити nisu sposobni samo da preuzmu glutamat, već takođe i da ga oslobode na ne-vezikularan način preko cistin-glutamatnog antiportera (sistem x_c^-), čime on aktivira ekstrasinaptičke receptore i menja sinaptičku aktivnost (Souza, 2015) .

S obzirom da astroцити imaju glavnu ulogu u preuzimanju i metabolizmu Glu, regeneraciji nervnog sistema i da aktivno učestvuju u recipročnoj komunikaciji sa neuronima putem morfološko-funkcionalne celine nazvane tripartitna sinapsa, smatra se da su oni ključni posrednici u promenama koje izaziva TMS (Cullen i Young, 2016).

Prekursor astroцита je radijalna glija koja je uključena u migraciju neurona u toku embrionskog razvoja mozga. Glija ćelije obezbeđuju neuronima neurotrofičke signale neophodne za preživljavanje, proliferaciju i diferencijaciju. Sinteza *GFAP*a je važan element u razvojnom programu diferencijacije astroцита. Strukturno podržavanje astroцитnih procesa preko *GFAP*-a je kritično u interakcijama neurona sa glijom, kao i za proces morfogeneze CNS-a. Neuronі mogu uticati na promotorski region *GFAP* gena i indukovati program astroцитne diferencijacije. Modulacija intermedijernih filamenata kao što je *GFAP* u astroцитima preko faktora rasta može uticati na ćelijsku diferencijaciju, kao i interakciju između ćelija u toku razvoja CNS-a (Gomes i sar., 1999).

Morfologija i heterogenost astroцита opisana je kod glodara različitog stepena starosti u toku razvojnog perioda na osnovu prisustva *GFAP* (Matthew A Olude 2015). Heterogenost astroцита kod mladih i adultnih životinja pokazuje prisustvo više različitih podtipova koji uključuju fibrozne astroците, uglavnom prisutne u corpus calosumu i moždanom stablu, protoplazmatične astroците u korteksu i dentatnom girusu, radijalnu gliju detektovanu u

olfaktornom bulbusu i subventrikularnoj zoni, gusto zbijene astrocite uglavnom prisutne u cerebelumu i hipokampusu, marginalne astrocite u blizini pia mater, Bergmanovu gliju u molekularnom sloju cerebeluma, i konačno, perivaskularne i periventrikularne astrocite u korteksu i trećoj ventrikuli. U radu je potvrđena različita regionalna heterogenost u pogledu tipa ćelija astrocita. Fibrozni astrociti su detektovani uglavnom na hipokampalnim presecima, protoplazmatični oblici predominantno u motornoj kori, dok su gusto zbijene forme astrocita opisane oko populacije granularnih neurona u cerebelumu i hipokampusu. Bergmanova glija se karakteristično imunohistohemijski boji u molekularnom sloju cerebeluma, dok su perivaskularni i periventrikularni astrociti identifikovani u regionu korteksa. Dobijeni rezultati rada potvrđuju heterogenost morfologije astrocita u mozgu Wistar pacova (slika VI 2). Detektovano histohemijsko obeležavanje astrocita u svim selektivno osetljivim moždanim strukturama pokazalo je smanjeni intenzitet kod mladih životinja (slika V 1.5) što nije u skladu sa prethodnim studijama i ukazuje da obe vrste *TBS* stimulacije oštećuju *GFAP* ekspresiju u odnosu na adultne životinje (Gomes i sar., 1999).

Moždano tkivo je zbog specifičnosti funkcija i velikih zahteva za nutrijentima, kiseonikom i posledično visokog metaboličkog obrta, izuzetno osetljivo na promene unutrašnje sredine. Međutim, nisu sve strukture mozga podjednako osetljive na promene, tako da možemo govoriti o selektivnoj osetljivosti pojedinih moždanih regiona kao što su treći sloj kore velikog mozga, CA1 i CA3 sektor hipokampusa, strijatum i *stratum purkinjese* cerebeluma. Pretpostavlja se da je u osnovi selektivne osetljivosti visoka koncentracija dopamina i velika ekspresija *NMDA* receptora. Kada su pojedine strukture mozga u stanju energetskog deficita i fiziološke koncentracije Glu mogu ispoljiti ekscitotoksično dejstvo (Cederberg i sar., 2014).

Osnovna paradigma je da *iTBS* dovodi do povećanja ekscitabilnosti, a da *kTBS* izaziva inhibitorne efekte u CNS-u. Do ovih podataka se došlo merenjem MEP-a nakon stimulacije motorne kore u zdravoj humanoj populaciji (Huang i sar., 2005). Međutim daljim ispitivanjima tačnog mehanizma odnosno smera promena ekscitabilnosti (facilitacija ili inhibicija) koje *TBS* izaziva često se dobijaju oprečni rezultati. Pokazano je da neke aktivnosti, kao što su voljno pomeranje određenih mišića, izvođenje kognitivnih zadataka ili pak ponavljanje stimulacije sa različitim periodima odmora između dve aplikacije, može dovesti do dobijanja potpuno suprotnog ishoda promene ekscitabilnosti ili čak izostajanja efekata (Gamboa i sar., 2011; Hoogendam i sar., 2010). Jedan od mehanizama kojim TMS

dovodi do ekscitacije odnosno inhibicije u CNS-u je promena nivoa oslobađanja neurotransmitera (Yue i sar., 2009).

Razvoj mozga se ne zaustavlja sa rođenjem, već nastavlja u toku rasta i razvoja jedinke. Sinaptičko remodelovanje (Cruz i sar., 2003) i mijelinizacija (Paus i sar., 1999) su najvažniji procesi u toku razvoja mozga. U tom smislu, starost životinja je jedna od kritičnih promenljivih veličina koja se u neuronaukama veoma često previdi. U mnogim istraživanjima koriste se mlade životinje, bez mogućnosti da su prisutne razlike između mladih i adultnih individua, što može biti posebno opasno ukoliko se ispituju osobine ili bolesti koje se ne javljaju kod odraslih. To je razlog izuzetne važnosti odabira starosne grupe životinja koja je od kritičnog značaja za dizajn i interpretaciju rezultata neurobioloških istraživanja (Mc Cutcheon J.E., 2009).

Istraživanja na mladim životinjama čiji mozak nije u potpunosti razvijen pružaju dragocene informacije. Međutim, starost životinja umnogome može uticati na rezultate istraživanja. Dodatno, takve mlade životinje se ne smeju definisati kao adulti. Studije su pokazale da mozak nastavlja da se razvija nakon puberteta, da se kvantitativne promene mogu dešavati postepeno ili veoma brzo i da se mehanizmi koji leže u osnovi neurobioloških procesa menjaju sa procesom sazrevanja. Istraživanja koja se sprovode na mladim životinjama često se ne mogu ekstrapolirati na odrasle jedinke. Dodatni veliki problem predstavlja i kontrola razvojnog stadijuma kod glodara, tako da se u različitim istraživanjima adulti definišu od P24-25 do P549 (P eng. *adolescent postnatal day*) (Larson i sar., 2005) dok se definicija mladih životinja kreće od P21-22 do P92 (Meredith i sar., 2003; Xu i sar., 2000). Promene ponašanja pacova kada iz perioda puberteta prelaze u odraslu jedinku kreće se oko 8 nedelje postnatalnog života (~P60) (Spear, 2000).

McCutcheon i Marinelli (Mc Cutcheon J.E., 2009) su pokazali da se mlade životinje koriste u čak 75% eksperimentalnih istraživanja. Moguće objašnjenje ove činjenice leži u ćelijskoj vizuelizaciji i identifikaciji u tkivu kod mladih životinja, primarno zbog sporijeg napredovanja procesa mijelinizacije. Pokazano je da se mijelinizacija dešava u toku prve postnatalne nedelje i kod glodara završava kompletno tri nedelje nakon rođenja (Doretto i sar., 2011). Ista studija pokazuje da u prvom postnatalnom danu (P1) uključenost oligodendrocita u proizvodnju mijelina umnogome utiče na uspostavljanje cerebelarnih

krugova. Takođe je opisan poremećaj regulacije u ekspresiji molekula uključenih u rast aksona, uspostavljanje veza i sinaptičku plastičnost.

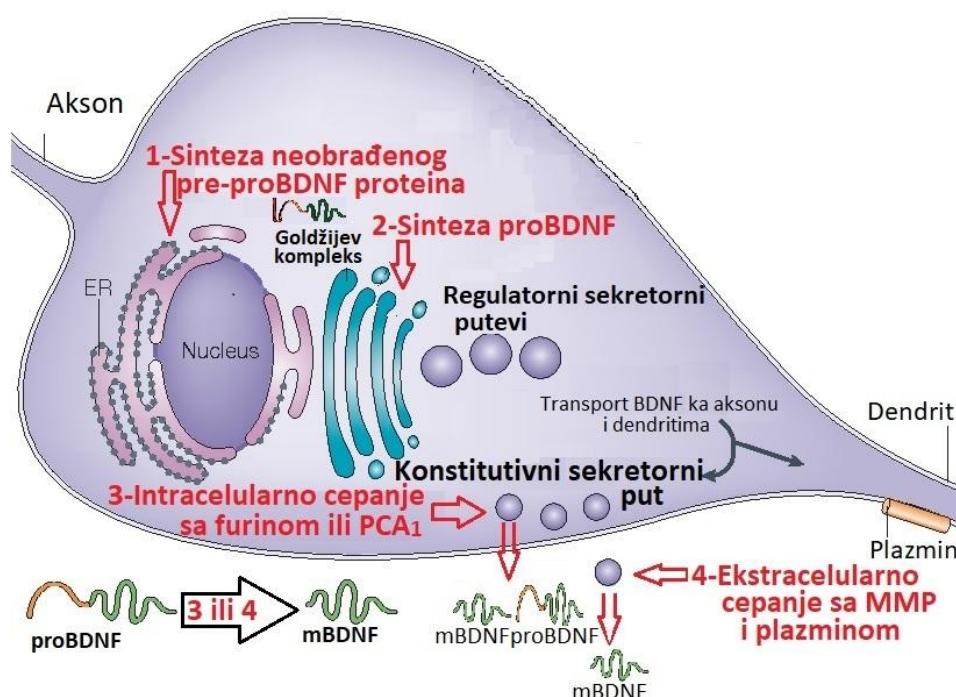
Već je pomenuto da se sinaptičke promene eksperimentalno ispoljavaju kao povećanje snage i funkcije sinapse kroz mehanizam dugotrajne potencijacije (*LTP*) ili kao proces smanjenja snage i funkcije, odnosno proces dugotrajne depresije (*LTD*). Takođe je potvrđeno da visokofrekventni protokoli rTMS dovode do pojave fenomena sličnih *LTP*, dok niskofrekventni protokoli izazivaju fenomene koji odgovaraju *LTD* (Pell i sar., 2011). Od posebnog interesa su i istraživanja *LTP* u kojima se koriste životinje različite starosne dobi u periodu pre, u toku i nakon puberteta (Mc Cutcheon J.E., 2009). U različitom uzrastu, *LTP* ispoljava različite funkcije preko brojnih mehanizama (Dumas, 2012). Yasuda i saradnici su 2003. godine pokazali da su promene u *LTP* putu regulisane u prve četiri postnatalne nedelje, što u sprovedenom istraživanju odgovara pacovima iz grupe mladih životinja (Yasuda i sar., 2003).

Druga grupa istraživača (Meredith i sar., 2003) je takođe pratila indukciju *LTP* u toku razvoja i pokazala da se efikasnost presinaptičke stimulacije sa pojedinačnim postsinaptičkim potencijalima u CA1-CA3 sinapsama postepeno smanjuje sa starošću kod adulta. Starosno zavisne promene koje su opisane u brojnim sistemima važne su istraživačima za identifikaciju razvojnog stadijuma njihovih eksperimentalnih subjekata koji su neophodni za primenu rezultata na adultima.

Za istraživanje koje je primenjeno na zdravim jedinkama *Wistar* pacova od značaja su posebno bili rezultati Arami i saradnika iz 2016. godine koji su pokazali da u toku postnatalnog razvoja glutamatergičke sinapse sazrevaju i menjaju *AMPA* i *NMDA* receptorsku aktivnost. U inicijalnim stadijumima razvoja, neke od moždanih sinapsi čine samo *NMDA* receptori i brzo umetanje *AMPA* receptora u ove sinapse doprinosi njihovom sazrevanju (Watt i sar., 2000). Potvrđene su značajne modifikacije glutamatergičke neurotransmisije od rođenja do starije dobi. Od naročitog je značaja promena amplitude *NMDA EPSC* u *AMPA EPSC* odnos koji dostiže svoj maksimum u drugoj postnatalnoj nedelji, a zatim opada do adultnog doba (Zhang i sar., 2014).

Poznate su brojne izuzetne funkcije koje *BDNF* ispoljava u mozgu sisara, kao i njegove uloge u razvoju neurona i glije, neuroprotekciji i modulaciji kratkotrajnih i dugotrajnih sinaptičkih interakcija važnih u procesima pamćenja (Kowianski i sar., 2018).

Već su objašnjeni procesi sinteze i maturacije *BDNF* koji uključuju nekoliko različitih prekursorskih izoformi; najpre se formira *BDNF* protein u endoplazmatičnom retikulumu kao pre-pro-*BDNF* prekursorska forma (Foltran i Diaz, 2016), a nakon translokacije u Goldži kompleks, uklanja se signalna sekvenca pre-regiona i stvara prekursor proneurotrofna forma *BDNF* (pro-*BDNF*) koja sa sledećim uklanjanjem prelazi u zrelu izoformu (m*BDNF*) (slika VI 1).



Slika VI 1. Shematska prezentacija sinteze i maturacije *BDNF*-modifikovano prema (Lu i sar., 2005; Marosi i Mattson, 2014)

BDNF- neurotrofični faktor moždanog porekla (eng. *brain derived neurotrophic factor*); *PCA₁* protein konvertaza 1 (eng. *protein convertase 1*); *MMA*-matriksne metalo-proteinaze (eng. *matrix metalloproteinase*)

Funkcija *BDNF* je usko povezana sa razvojem mozga, različitim ćelijskim komponentama moždanog tkiva, kao i molekulskim mehanizmima signalne transdukcije aktiviranim u fiziološkim ili patološkim uslovima. Važnost *BDNF* potvrđena je preko novootkrivenih mehanizama aktivacije signalnih puteva, neurogeneze i gliogeneze, kao i sinaptičke plastičnosti.

Prisustvo *BDNF* je potvrđeno u skoro svim regionima mozga (Hofer i sar., 1990). Njegove funkcije se razlikuju u zavisnosti od razvojnog stadijuma mozga, kao i neuronskih,

glijalnih i vaskularnih jedinica moždanog tkiva. U najvažnije funkcije *BDNF* spadaju procesi razvoja, regulacija neuro-, glio- i sinaptogeneze, kao i kontrola kratkotrajnih i dugotrajnih sinaptičkih interakcija, što direktno utiče na mehanizme pamćenja i memorije (Foltran i Diaz, 2016).

VI 1. Promene kod jednokratno tretiranih životinja

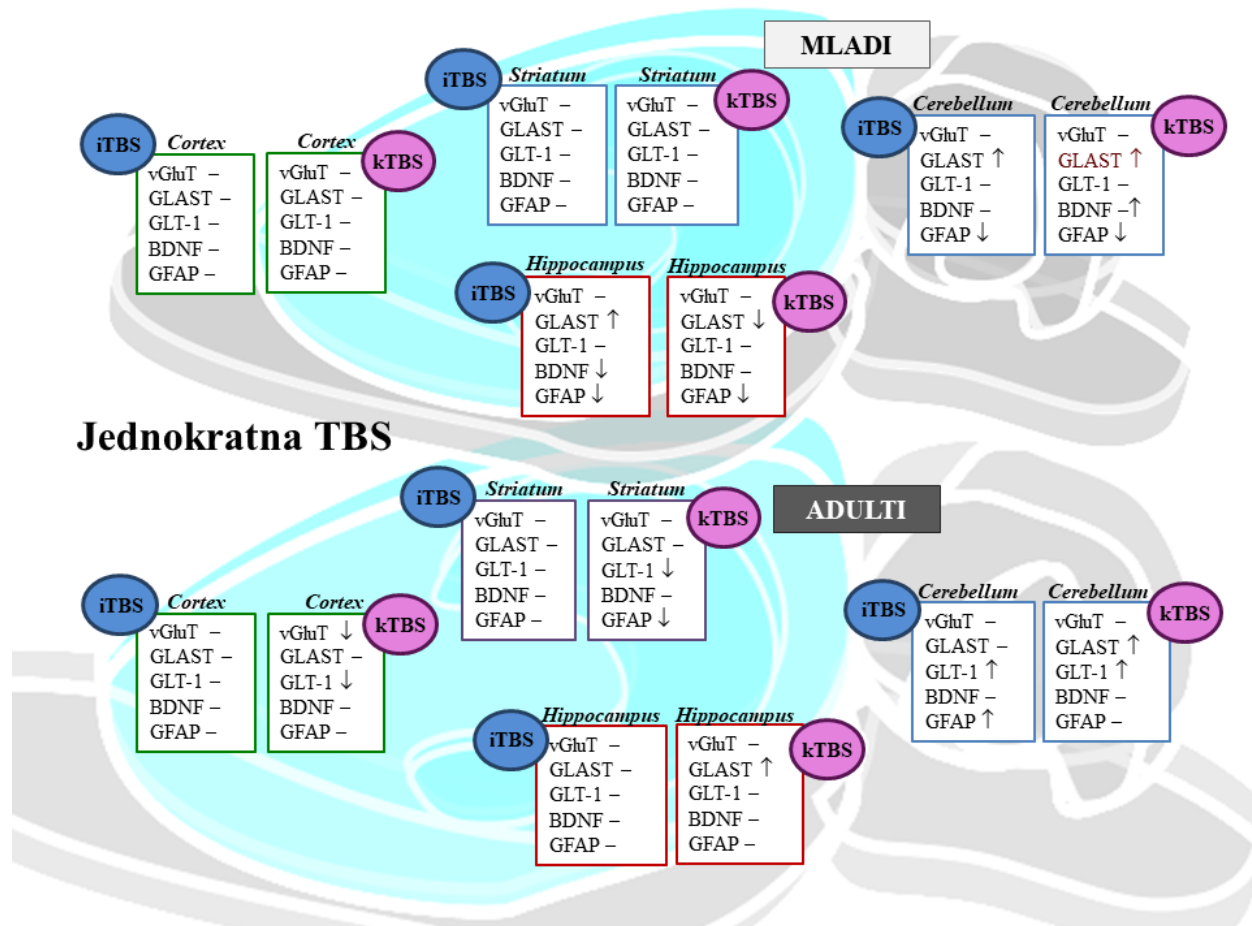
1.1. Tkivne promene kod jednokratno tretiranih životinja

Jednokratni protokol intermitentne i kontinuirane *TBS* izaziva promenu ekspresije membranskih i vezikularnih transportera za glutamat u selektivno osetljivim strukturama mozga (motornoj kori, strijatumu, hipokampusu i malom mozgu) mladih životinja, kao i adultnih pacova. Takođe, rezultati istraživanja pokazuju da jednokratna *iTBS*, kao i *kTBS* menja ekspresiju neurotrofičnog faktora moždanog porekla *BDNF* u ispitivanim strukturama mozga mladih i adultnih životinja.

Na slici VI 2. prikazane su sumarno tkivne promene u selektivno osetljivim moždanim strukturama nakon jednokratne aplikacije *iTBS/kTBS*.

Sinaptička funkcija glutamata regulisana je na više nivoa, od transporta u sinaptičke vezikule, preko oslobađanja u sinaptičku pukotinu, do preuzimanja preko glija ćelija i neurona. Vezikularni glutamatni transporter (*vGluT-1*) je uključen u presinaptički transport glutamata iz citoplazme u sinaptičke vezikule (Zink i sar., 2010). U istraživanju je pokazano da je primena *kTBS* protokola dovela do smanjenja ekspresije *vGluT-1* samo u regionu kore prednjeg mozga u odnosu na placebo grupu kod adultnih životinja (slika V 1.1.a). Preuzimanje glutamata iz sinapse omogućeno je transporterima ekscitatornih amino-kiselina (*EAAT*). Preko 90% glutamata je preuzeto preko *EAAT2* (*GLT-1* kod glodara) čija je ekspresija dominantna u astrocitima (Fontana, 2015). Ovaj podatak je u skladu sa rezultatima sprovedenog istraživanja jer je *kTBS* protokol smanjio ekspresiju *GLT-1* kod adulta u motornom korteksu (slika V 1.3a; $p < 0,05$) i strijatumu (slika V 1.3b; $p < 0,05$), što je bilo praćeno smanjenom ekspresijom *GFAP* (u regionu strijatuma; slika V 1.5b; $p < 0,05$). Suprotno, u cerebelumu su oba protokola (*iTBS*, $p < 0,01$; *kTBS*, $p < 0,001$) dovela do povećanja ekspresije *GLT-1* (V 1.3d) uz istovremeno povećanje ekspresije *GFAP* (*iTBS*) kod adultnih životinja u odnosu na placebo grupu (V 1.5d; $p < 0,05$). Ovi rezultati se mogu objasniti činjenicom da iako je poznato da *GLT-1* ima neznčajnu ulogu u uklanjanju oslobođenog glutamata iz sinapse zbog male prisutnosti u cerebelumu, registrovano povećanje njegove ekspresije (slika V 1.3) u ovoj moždanoj strukturi ukazuje na povećanu

potrebu za uklanjanjem glutamata iz sinaptičke pukotine. Takođe, povećanje *GLT-1* pokazuje i veću efikasnost preuzimanja glutamata koja može redukovati ekscitatornu i inhibitornu transmisiju (Takatsuru i sar., 2007).



Slika VI 2. Uticaj jednokratne TBS stimulacije (iTBS, kTBS) na imunohistohemijske promene u selektivno osetljivim strukturama mozga odnosu na kontrolnu (placebo) grupu kod mladih i adultnih životinja.

iTBS-intermitentna stimulacija teta praskovima (eng. *intermittent theta burst stimulation*); kTBS-kontinuirana stimulacija teta praskovima (eng. *continuous theta burst stimulation*); vGluT-vezikularni glutamatni transporter 1 (eng. *vesicular glutamate transporter*); GLAST- transporter ekscitatornih amino-kiselina 1 (eng. *glutamate aspartate transporter*); GLT-1-transporter ekscitatornih amino-kiselina 2 (eng. *glutamate transporter*); BDNF-neurotrofični faktor moždanog porekla (eng. *brain derived neurotrophic factor*); GFAP -glijalni fibrilarni kiseli protein (eng. *glial fibrillary acidic protein*)

Poznato je da kTBS može indukovati supresiju, a iTBS ekspresiju ekscitatorne sinaptičke transmisije (Funke i Benali, 2011; Huang i sar., 2005). Primena oba protokola u istraživanju na mladim životinjama dovodi do promena u ekspresiji GLAST u regionima udaljenim od mesta direktne stimulacije (slika V 1.2). Ekspresija GLAST povezana je sa

regulacijom nivoa ekstracelularnog glutamata, uključena je u kontrolu neurotransmisije, kao i sprečavanje ekscitotoksičnog oštećenja neurona. Kod mladih životinja, povećana ekspresija *GLAST* registrovana je u regionu cerebeluma uz istovremeno smanjenu ekspresiju *GFAP* (slika V 1.5d). Takođe, u hipokampusu je registrovano povećanje ekspresije *GLAST* i smanjenje ekspresije *GFAP* nakon primene *iTBS*, dok primena *kTBS* smanjuje ekspresiju *GLAST* i ekspresiju *GFAP* u odnosu na placebo grupu mladih životinja (slika V 1.2c). Kod adultnih životinja, povećana ekspresija *GLAST* je registrovana u regionu malog mozga i hipokampusa samo nakon jednokratne primene *kTBS* protokola u odnosu na placebo životinje (slika V 1.2c,d).

Astroцити imaju glavnu ulogu u modelovanju nervnog sistema u toku ontogeneze. Kako predstavljaju osnovni tip glijа ćelija koji pored brojnih funkcija u pasivnom podržavanju preživljavanja neurona, regulišе i održavanje sinapse i promoviše njihovu eliminaciju, može se reći da učestvuju u regulaciji kompletne arhitekture i aktivnosti neuronskih krugova. Noviji radovi pokazuju da u cerebralnom korteksu sisara neuroni grade specifične slojeve i formiraju veze kako unutar korteksa, tako i sa drugim regionima mozga koji čine specijalizovane sinaptičke veze gradeći različite neuronske krugove. Astroцити imaju glavnu ulogu u regulaciji formiranja i funkcionisanja sinapse u toku razvoja. Cerebralni korteks je kompleksna moždana struktura koja vrši koordinaciju senzornih i motornih informacija čime omogućava životinji da izvodi složene zadatke. Neuroni u korteksu su raspoređeni u definisanim slojevima i komuniciraju preko tih slojeva kao i sa drugim kortikalnim i subkortikalnim strukturama. Pokazano je u CNS-u miševa da je ekspresija *GFAP*-a prvi put registrovana na kraju gestacije. Transkripcione studije pokazuju da se iRNK za *GFAP* povećava između rođenja i 55. postnatalnog dana (Farhy-Tselnicker i Allen, 2018), što može objasniti dobijeno povećanje ekspresije *GFAP* u motornom korteksu adultnih pacova nakon jednokratne primene *iTBS* protokola u odnosu na placebo grupu (slika V 1.5a).

Poznato je da glutamat povećava fosforilaciono stanje *GFAP* u hipokampalnim neuronima pacova 12-16 postnatalnog dana u reakciji koja je zavisna od ekstracelularnog Ca^{2+} . Odgovor glutamata je posredovan G-protein vezujućom grupom II metabotropnih receptora (mGluR). S obzirom da grupa II mGluR ne deluje preko oslobađanja Ca^{2+} iz internalnih depoa, pretpostavlja se da aktivacija receptora preko glutamata inhibira ulazak Ca^{2+} u astroците i posledično nishodno regulišе Ca^{2+} -zavisnu defosforilacionu kaskadu čime regulišе fosforilaciono stanje *GFAP*a (Rodnight i sar., 1997). Ovo je moguće objašnjenje za

registrovano smanjenje ekspresije *GFAP* kod mladih životinja nakon jednokratne primene oba protokola u regionu hipokampusa u odnosu na placebo grupu životinja (slika V 1.5c; $p < 0,05$). Stimulacija *iTBS* ili *kTBS* protokolom je mogla da aktivira mGluR grupe II, čime je inhibiran ulazak Ca^{2+} u astrocite i smanjena Ca^{2+} -zavisna defosforilaciona kaskada. U periodu završene sinaptogeneze, kod mladih životinja je redukovano oslobađanje glutamata iz sinapsi, što može biti signal za smanjenje fosforilacionog stanja *GFAPa* i posledičnu redukciju broja astrocita koja je registrovana na hipokampalnim presecima nakon primene *iTBS* ili *kTBS* protokola.

Strijatum je kod glodara struktura koja predstavlja dobar model za analizu interakcija između astrocita i sinapse što predstavlja osnovu plastičnosti. Mehanizmi koji se prate/podstiču specifične promene kortikostrijatne ili talamostrijatne sinaptičke transmisije baziraju se na oslobađanju astrocita i preuzimanju glutamata (Dvorzhak i sar., 2018). U radu je vizualizacijom i ImageJ kvantifikacijom *GFAP* astrocita jednokratna u odnosu na višekratnu primenu *iTBS* protokola pokazala mnogo veći intenzitet u strijatumu kod mladih životinja ($p < 0,001$), što potvrđuje da ponovljena stimulacija inhibira ekspresiju ovog molekula (slika V 1.5b). Dobijena vrednost je daleko manja i od ekspresije *GFAP* nakon višekratne primene *iTBS* kod adulta i dodatno pokazuje da su mlade životinje naročito osetljive na *iTBS* stimulaciju.

Hipokampus je region uključen u mnogobrojne forme dugotrajne memorije kod ljudi i životinja, a sa druge strane veoma važna struktura delovanja *BDNF* (Binder i Scharfman, 2004). Imunohistohemijske studije su pokazale da je u hipokampusu *BDNF* lokalizovan u nukleusu granularnih ćelija dentatnog girusa i ćelija piramidalnog sloja (Katoh-Semba i sar., 1997). Jednokratna primena *iTBS* protokola u hipokampusu mladih životinja dovodi do smanjenja ekspresije *BDNF* (slika V 1.4c), što nije u skladu sa rezultatima drugih autora (Katoh-Semba i sar., 1997; Nawa i sar., 1995; Radka i sar., 1996). Objašnjenje za ovo neslaganje u istraživanjima različitih grupa autora može biti u imunohistohemijskoj analizi koja pokazuje različitu intracelularnu distribuciju *BDNF*. Kao prvo, u publikovanim radovima, *BDNF* protein je pronađen kao granularna forma u nukleusu, ali ne i u citoplazmi neurona hipokampusa starosti mesec dana. Takođe, studije pokazuju da se 100% *BDNF* proteina u hipokampusu dobija iz membranske, a ne solubilne frakcije (Katoh-Semba i sar., 1997). Ovaj podatak je u saglasnosti sa odsustvom bojenja citoplazme hipokampalnih

neurona sa anti-*BDNF* antitelom. Takođe, prisutna je nuklearna lokalizacija *BDNF* proteina u hipokampusu, jer se jedna polovina *BDNF* proteina dobija iz čiste nuklearne frakcije.

1.2. Biohemijske promene kod jednokratno tretiranih životinja

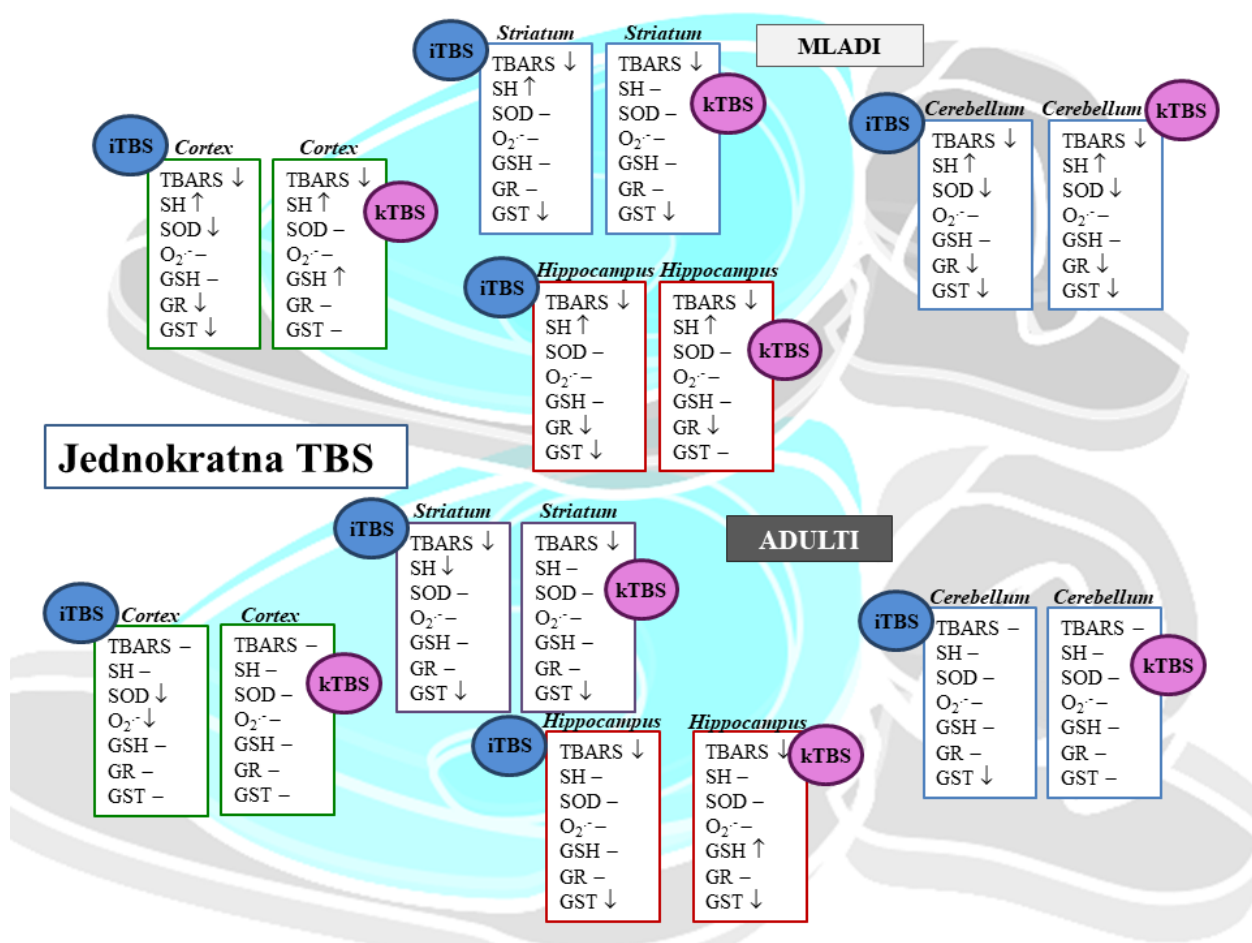
Smatra se da je u osnovi oštećenja nervnog tkiva tokom starenja toksično dejstvo RV koje se normalno stvaraju tokom aerobnih metaboličkih reakcija. Tkivo mozga je naročito osetljivo na štetno dejstvo ovih molekula, jer je njihova proizvodnja po gramu moždanog tkiva veća nego u bilo kom drugom organu. Uzroci povećane proizvodnje RV su veliki metabolički zahtevi za kiseonikom, jer za nutritivne potrebe tkivo mozga skoro isključivo koristi aerobnu glikolizu, kao i nedovoljna snabdevenost molekulima koji učestvuju u antioksidativnoj zaštiti. Takođe, sastavni deo membrana ćelija CNS-a u visokom procentu čine polinezasićene masne kiseline, čije nezasićene veze ih čine pogodnom metom oštećenja RV (Reiter, 1995).

Na slici VI 3. su šematizovano prikazane biohemijske promene kod mladih i adultnih životinja koje su tretirane *iTBS* i *kTBS* protokolom u odnosu na kontrolnu (placebo) grupu životinja.

Kod mladih životinja, u svim izdvojenim moždanim strukturama- korteksu, strijatumu, hipokampusu i malom mozgu, koncentracije *TBARS* bile su smanjene i nakon *iTBS* i nakon *kTBS* tretmana (slika V 2.1.). Registrovano smanjenje LPO bilo je praćeno povećanjem SH grupa u svim navedenim strukturama sa oba tretmana, uz izuzetak nepromenjenih vrednosti SH grupa u strijatumu životinja koje su bile tretirane protokolom *kTBS* (slika V 2.4.). Uzimajući u obzir da *TBARS* predstavljaju krajnje proizvode u procesu LPO ćelijskih membrana, a koncentracija ukupnih SH grupa indikator oksidativnog „ataka“ na ćelijske proteine, ovakve promene upućuju na unapređeno redoks stanje tkivnih komponenti u moždanoj kori, strijatumu, hipokampusu i cerebelumu kod mladih životinja.

Smanjenje koncentracije *TBARS* registruje se i kod adultnih životinja, ali samo u strijatumu i hipokampusu, dok je ovaj parametar u moždanoj kori i cerebelumu nepromenjen (slika V 2.1.). Sve analizirane tkivne strukture kod adultnih životinja bile su otpornije na oksidativno oštećenje proteina, što se vidi po nepromenjenim (kontrolnim) vrednostima SH grupa. Izuzetak predstavlja smanjenje SH grupa u strijatumu odraslih životinja koje su bile jednokratno tretirane *iTBS* protokolom (slika V 2.4.). Ovakvi rezultati kod mladih životinja upućuju na značajno otpornije lipidne membrane kao i očuvanu funkciju i strukturu proteina

u odnosu na delovanje slobodnih radikala koje je podstaknuto tretmanima *iTBS* i *kTBS*. Kod adultnih životinja registruje se povoljan efekat na LPO, dok se čini da proteinske strukture odolevaju delovanju oksidanasa. Jedino u strijatumu adulta, smanjenje SH govori o značajnijim oksidativnim promenama u proteinima koji su posledica delovanja *iTBS* tretmana, što može biti posledica selektivne osetljivosti strijatuma na delovanje slobodnih kiseoničnih radikala.



Slika VI 3. Šematizovan prikaz promena biohemijskih parametara u selektivno osetljivim strukturama mozga kod mladih i adultnih životinja jednokratno tretiranih obrascima intermitentne i kontinuirane TBS

iTBS-intermitentna stimulacija teta praskovima (eng. *intermittent theta burst stimulation*); *kTBS*-kontinuirana stimulacija teta praskovima (eng. *continuous theta burst stimulation*); *TBARS*-tiobarbiturna kiselina-reagujućih supstanci (eng. *thiobarbituric acid reactive species*); *SH*-sulfhidrilne grupe; *SOD*-superoksid dizmutaza; *O₂^{·-}*-superoksid anjon radikala; *GSH*-redukovani glutation; *GR*-glutation reduktaza; *GST*-glutation-S-transferaza

Kod mladih životinja, znatno bolje redoks stanje lipidnih membrana i proteina nakon delovanja *iTBS* u moždanoj kori i cerebelumu, praćeno je nepromenjenim stvaranjem $O_2^{\cdot-}$ (slika V 2.2a,d), ali i smanjenom aktivnošću enzima SOD (slika V 2.3a,d), GR (slika V 2.6a,d) i GST (slika V 2.7a,d). Očuvana je i koncentracija GSH (slika V 2.5a,d). U strijatumu i hipokampusu, nakon jednokratnog delovanja *iTBS*, registruje se takođe neizmenjena produkcija superoksida (slika V 2.2b,c), očuvana koncentracija GSH (slika V 2.5b,c) i neizmenjena, kontrolna aktivnost SOD (slika V 2.3b,c). U strijatumu se registruje nepromenjena aktivnost GR (slika V 2.6b) i smanjena aktivnost GST (slika V 2.7b), dok su aktivnosti GR (slika V 2.6c) i GST (slika V 2.7c) smanjene, kao i u moždanoj kori i malom mozgu.

Dobijeni podaci upućuju na zaključak da jednokratno delovanje *iTBS*, koje podstiče ekscitatorni obrazac aktivnosti neurona, kod mladih životinja nema za posledicu promenu redoks stanja moždanog tkiva koje se nalazi neposredno ispod zone delovanja kabela, kao što su to moždana kora i cerebelum, ali ni u strukturama koje se nalaze dublje, subkortikalno. Intermitentni obrazac *TBS* podstiče aktivnost neuronskih skupova koji promovišu jačanje sinapsi, glutamatergičku neurotransmisiju i promene koje su slične *LTP* (Opie i sar., 2017). Pritom, strijatum i hipokampus su strukture veoma bogate glutamatergičkim projekcijama, koje su po prirodi svoje neurotransmisije upravo podložne povećanom nastanku slobodnih radikala (Hernandez-Espinosa i sar., 2019). Dodatno, strijatum prima i dopaminergičke projekcije iz *pars compacta substantia nigra*, sa čijih se krajeva oslobađa dopamin, čijom autooksidacijom nastaju slobodni kiseonični radikali (Kurosaki i sar., 2019). Sa aspekta promene redoks stanja dakle, ova procedura rTMS se kod jednokratne primene *iTBS* može smatrati bezbednom.

Neizmenjena produkcija superoksida u svim analiziranim moždanim strukturama registruje se i nakon jednokratne primene *kTBS* kod mladih životinja (slika V 2.2). Nakon delovanja ovog protokola beleži se očuvana vrednost GSH (slika V 2.5). Štaviše, u moždanoj kori, registruje se povećanje GSH (slika V 2.5a) i nepromenjena aktivnost enzima SOD (slika V 2.3a), GR (slika V 2.6a) i GST (slika V 2.7a). U strijatumu je smanjena aktivnost GST (slika V 2.7b), a nepromenjena aktivnost GR (slika V 2.6b), dok je u hipokampusu nepromenjena aktivnost GST (slika V 2.7c) i smanjena aktivnost GR (slika V 2.6c). U obe ove strukture, registruje se nepromenjena aktivnost SOD (slika V 2.3b,c), što je u skladu sa neizmenjenim stvaranjem superoksida.

Premda se u cerebelumu mladih životinja nakon jednokratnog delovanja *kTBS* registruje smanjena LPO (slika V 2.1d), povećana koncentracija SH grupa (slika V 2.4d) i nepromenjena produkcija superoksida (slika V 2.2d), što je znak veoma očuvanog, čak unapređenog redoks stanja, promene na nivou aktivnosti enzima su značajne- nalazi se smanjenje aktivnosti SOD (slika V 2.3d), GR (slika V 2.6d) i GST (slika V 2.7d).

Aplikovan jednokratno kod mladih životinja, kontinuirani obrazac *TBS* ima sličan efekat na redoks stanje moždanih struktura kao i *iTBS*- ne narušava antioksidativnu odbranu i čak podstiče otpornost lipidnih membrana i proteina na delovanje slobodnih radikala. Za razliku od *iTBS* koji podstiče ekscitatorni obrazac neuronske aktivnosti, *kTBS* stimuliše neuronske skupove koji u svojoj osnovi imaju inhibitorni izlazni biološki signal, odnosno stimuliše niz promena koje su slične fiziološkim promenama kod *LTD* (Noh i sar., 2012). Oštećujući efekti se ne registruju kod mladih životinja ni u zoni mozga koje se nalaze neposredno ispod poglavine na koju naleže kalem, ali ni u subkortikalnim strukturama- strijatumu i hipokampusu. Kako se podsticaj inhibitorne aktivnosti neurona vezuje dominantno za najrasprostranjeniji inhibitorni neurotransmiter u CNS- *GABA*, nađene najintenzivnije promene u cerebelumu se mogu objasniti upravo očekivanim uticajem na mnogobrojne *GABA*rgičke neurone kore malog mozga (Woo i sar., 2018). Glavne izlazne eference kore malog mozga su *GABA*rgička vlakna koja se završavaju na neuronima dubokih jedara malog mozga, na kojima se menja kvantitet oslobođene *GABA* na osnovu prilagođenih molekulskih mehanizama koji se podešavaju upravo principom *LTD* (Ninković M, 2017), a zatim funkciju ponovo preuzimaju glutamatergičke projekcije koje iz dubokih jedara cerebeluma idu prema svojim ciljnim neuronima retikularne formacije i talamusa, odnosno moždane kore (McKimm i sar., 2014). Metabolizam *GABA*, kao i metabolizam glutamata, veoma su blisko vezani sa metabolizmom GSH, odnosno glutamina. Naime u glutamatergičkim neuronima glutamin se konvertuje u Glu, dok se u *GABA*ergičkim neuronima od njega kao prekursora sintetiše *GABA*. Iz sinaptičke pukotine *GABA*u preuzimaju astrociti i metabolišu je najpre u Glu, a potom u glutamin. Tako sintetisan glutamin napušta astrocite i potom se ponovo koristi za sintezu ova dva transmitera (Belanger i Magistretti, 2009).

Astrociti oslobađaju GSH u ekstracelularni prostor, gde se aktivnošću enzima γ glutamil transferaze (γ GT) stvara CysGly kompleks i glutamat. Ovaj dieptid preuzimaju neuroni za njega vezuju Glu i sintetišu GSH (Belanger i Magistretti, 2009).

Biohemijske promene koje se registruju u moždanim strukturama odraslih životinja nakon jednokratnog delovanja *iTBS* i *kTBS*, slične su onima koje se registruju kod mladih, ali su zaštitni efekti stimulacije nešto manje izraženi.

Smanjenje LPO beleži se u dubljim strukturama- strijatumu (slika V 2.1b) i hipokampusu (slika V 2.1c), uprkos njihovim značajnim osobinama koje ih čine podložnim nastanku peroksidacije (Vi resen-Filho i sar., 2015). Smanjenje *TBARS* međutim (koje se registruje kod mladih), ne beleži se u moždanoj kori (slika V 2.1a) i malom mozgu (slika V 2.1d). Ovakve promene govore o očuvanom redoks stanju i fiziološkoj odbrani lipidnih membrana od oksidativnog delovanja u svim ispitivanim strukturama mozga odraslih pacova, s tim da su promene manje izražene u odnosu na mlade životinje.

Koncentracija SH grupa je očuvana u svim moždanim strukturama adulta (slika V 2.4) nakon aplikovanja oba jednokratna *TBS* protokola. Izuzetak je smanjena koncentracija SH u strijatumu kod aplikovanja *iTBS* (slika V 2.4b; $p < 0,01$). Kod odraslih životinja, smanjenje SH grupa u strijatumu upućuje na značajni efekat *iTBS* na oksidaciju SH grupa i pojačani nastanak S-S mostova u proteinima. Ova reakcija ima zaštitnu funkciju u odbrani proteina od strukturnih promena koji bi mogli trajno da im naruše funkciju (Yao i sar., 1997).

Korelativnom analizom pokazano je da jednokratna primena *kTBS* protokola pokazuje pozitivnu korelaciju ($R = 0.886$, $p < 0,05$) u korteksu, odnosno negativnu korelaciju ($R = -0.899$, $p < 0,05$) u strijatumu u odnosu na aktivnost GST između mladih i adultnih životinja (tabela 2). Dobijeni rezultati mogu se objasniti smanjenjem redukovane forme GSH, supstrata za GST u strijatumu, što je pokrenuto jednokratnim *kTBS* stimulusom i rezultiralo redukovanom aktivnošću enzima.

Uprkos smanjenju SH grupa u strijatumu adultnih životinja nakon jednokratnog *iTBS*, u odnosu na aktivnost enzima, registruju se istovetne promene onima kod mladih životinja- nepromenjena aktivnost SOD (slika V 2.3b), GR (slika V 2.6b) i GST (slika V 2.7b). Takođe, registruje se nepromenjena produkcija superoksida (slika V 2.2b) i očuvana koncentracija GSH (slika V 2.5b), što upravo podstiče gore navedenu pretpostavku o tome da se smanjenje SH grupa dešava reverzibilno, na proteinima, a ne na ključnom ćelijskom antioksidansu- glutationu (Vujotic i sar., 2020). Ovakvi rezultati kod odraslih životinja upućuju na značajno otpornije lipidne membrane i nešto fragilniju otpornost proteina u odnosu na delovanje slobodnih radikala koje je podstaknuto jednokratnim tretmanima *iTBS* i *kTBS*.

Takođe, dobijeni rezultati korelativne analize kod određivanja aktivnosti SOD pokazuju identičan trend promena u motornoj kori i strijatumu. Jednokratnom *kTBS* aplikacijom dobijena je pozitivna korelacija ($R= 0.928$, $p<0,05$) u korteksu, dok je jednokratna *iTBS* primena dovela do pojave negativne korelacije ($R= -0.861$, $p<0,05$) u strijatumu u odnosu na aktivnost SOD između mladih i adultnih životinja (tabela 2). Mogući razlog nelinearnosti koja se registruje u strijatumu adulta jeste pokrenuta ekscitotoksičnost i povećanje RVK koje antioksidativni enzim ne može u potpunosti ukloniti kao kod mladih životinja.

Kod adultnih životinja, očuvano redoks stanje lipidnih membrana i proteina nakon jednokratnog delovanja *iTBS*, u moždanoj kori i cerebelumu, praćeno je nepromenjenim aktivnostima enzima SOD (slika V 2.3a,d) i GR (slika V 2.6a,d), kao i očuvanim koncentracijama GSH (slika V 2.5a,d). U moždanoj kori registruje se čak smanjenje superoksida (slika V 2.2a; $p<0,01$), dok je u cerebelumu njegovo stvaranje na nivou kontrolnog (slika V 2.2d). Aktivnost GST je u moždanoj kori nepromenjena (slika V 2.7a), dok se u cerebelumu registruje smanjenje aktivnosti ovog enzima (slika V 2.7d; $p<0,01$). Jednokratno aplikovan obrazac *iTBS* u hipokampusu dovodi do smanjenja aktivnosti GST (slika V 2.7c), dok su aktivnosti SOD (slika V 2.3c) i GR (slika V 2.7c), kao i stvaranje superoksida (slika V 2.2c) i sadržaj GSH (slika V 2.5c) na nivou kontrolnih. Sa aspekta promene redoks stanja moždanih struktura pacova, jednokratna primena *iTBS* protokola se kod odraslih životinja može smatrati bezbednom procedurom.

U svim analiziranim moždanim strukturama, nakon jednokratne primene *kTBS* kod odraslih životinja registruje se neizmenjena produkcija superoksida (slika V 2.2) i očuvana koncentracija GSH (slika V 2.5). Štaviše, u hipokampusu (kod mladih životinja ovo je registrovano u moždanoj kori), beleži se povećanje GSH (slika V 2.5d). U svim strukturama takođe, javlja se nepromenjena aktivnost SOD (slika V 2.3) i GR (slika V 2.6). U moždanoj kori i cerebelumu registruje se nepromenjena aktivnost GST (slika V 2.7a,d) dok je u strijatumu i hipokampusu ona smanjena (V 2.7b,c).

Aplikovan jednokratno kod adultnih životinja, kontinuirani obrazac *TBS* ima sličan efekat na redoks stanje moždanih struktura kao i *iTBS*- ne narušava antioksidativnu odbranu i čak podstiče otpornost lipidnih membrana u strijatumu i hipokampusu na delovanje slobodnih radikala. Za razliku od jednokratno aplikovanog *iTBS* koji u strijatumu proteine čini

osetljivijim na delovanje radikala (smanjene SH grupe), *KTBS* ne narušava oksidativnu odbranu proteinskih struktura.

Strukturne i biohemijske promene koje se tokom razvoja mozga dešavaju u strijatumu čine ga sa starenjem podložnijim delovanju slobodnih kiseoničnih radikala (Stefanatos i Sanz, 2018). Strijatum prima bogate dopaminergičke projekcije koje na *GABA*ergičkim neuronima ispoljavaju bitnu funkciju u regulisanju direktnog i indirektnog puta motorne petlje, delujući pritom na D_1 grupu ekscitatornih, ali i na D_2 grupu inhibitornih dopaminergičkih receptora (Jupp i sar., 2013). Ove dopaminergičke projekcije dolaze iz zone *pars compacta substantije nigrae* u kojoj se koncentracija jona gvožđa sa starenjem povećava, čineći ga posebno podložnim oštećenju putem slobodnih radikala, odnosno pokrenutog procesa LPO. Takođe, usled visokog metaboličkog obrta dopamina u strijatumu i njegove autooksidacije nastaje superoksid anjon a zatim i H_2O_2 , čime se stvaraju uslovi za produkciju veoma agresivnog hidroksilnog radikala OH^\bullet koji pokreće *circulus vitiosus* i proces oštećenja membrana ćelije (Baluchnejadmojarad i sar., 2017).

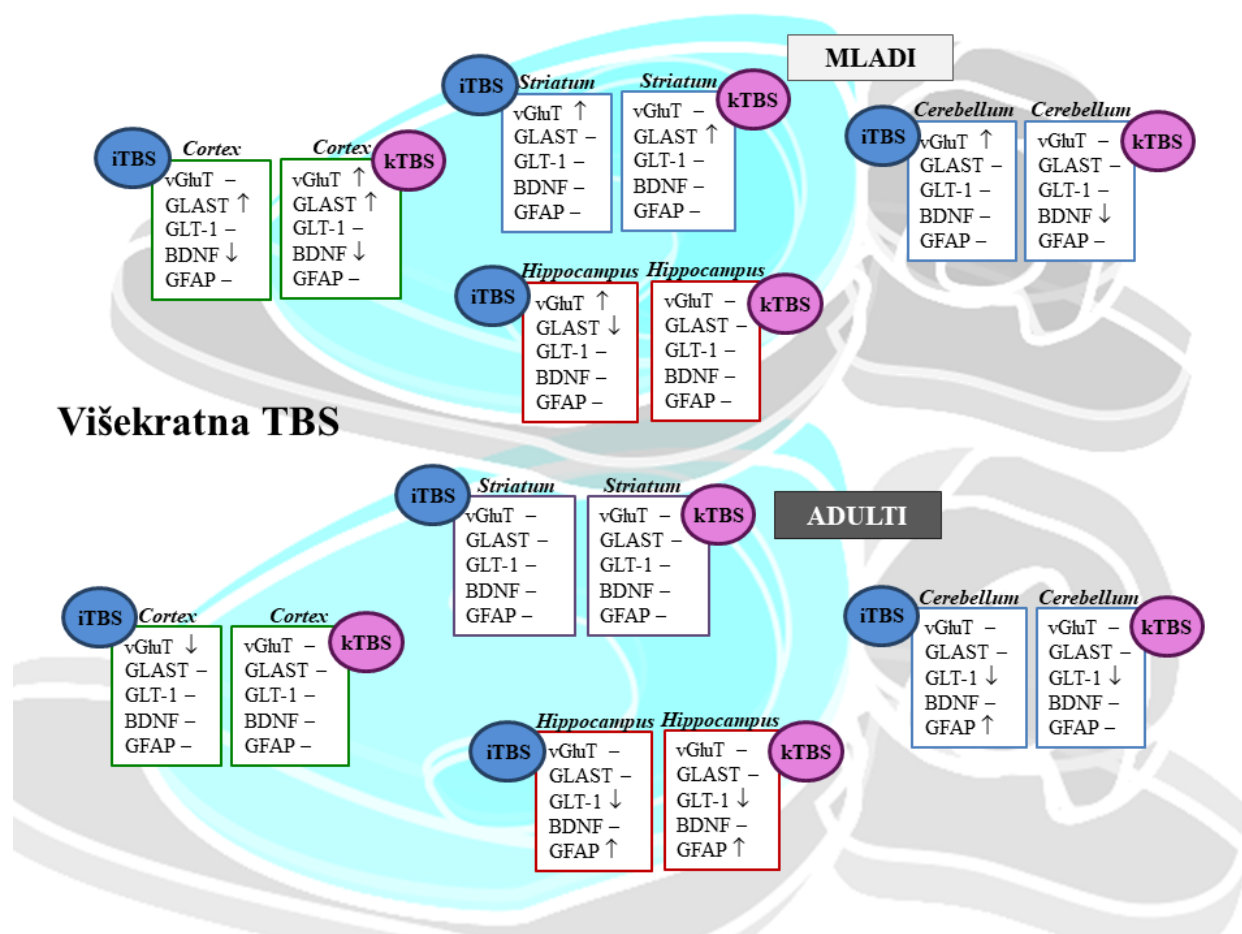
Podaci iz literature o redoks stanju selektivno osetljivih moždanih struktura nakon jednokratnog tretiranja adultnih životinja obrascima *iTBS* i *KTBS* do sada nisu objavljeni. Procenom oksidativnog stanja dobijen je uvid u stepen metaboličkih promena u selektivno osetljivim moždanim strukturama pacova. Kako u literaturi nema podataka o istraživanjima primene TMS na zdravim životinjama, proširenje saznanja o ovim mehanizmima na životinjskom modelu, uz rezultate elektrofizioloških istraživanja na zdravim dobrovoljcima, opravdava primenu rTMS kod zdravih osoba, u svrhu poboljšanja koncentracije, pažnje i kognicije. U tom smislu, moguće je i eventualno proširenje terapijskih mogućnosti za kombinovanu primenu TMS sa farmakološkim sredstvima, čime bi se poboljšala perspektiva lečenja različitih poremećaja nervnog sistema (Makani i sar., 2017).

VI 2. Promene kod višekratno tretiranih životinja

2.1. Tkivne promene kod višekratno tretiranih životinja

Višekratna primena *iTBS* i *KTBS* protokola uzrokuje promenu ekspresije membranskih i vezikularnih transportera za glutamat u motornoj kori, strijatumu, hipokampusu i malom mozgu, kao i ekspresiju *BDNF* u selektivno osetljivim strukturama mozga mladih i adultnih pacova. Šematizovane imunohistohemijske promene u selektivno u selektivno osetljivim

moždanim strukturama pacova nakon višekratne aplikacije iTBS i kTBS prikazane su na slici VI 4.



Slika VI 4. Uticaj višekratne TBS stimulacije (iTBS, kTBS) na imunohistochemijske promene u selektivno osetljivim strukturama mozga u odnosu na kontrolnu (placebo) grupu kod mladih i adultnih životinja.

iTBS-intermitentna stimulacija teta praskovima (eng. *intermittent theta burst stimulation*); kTBS-kontinuirana stimulacija teta praskovima (eng. *continuous theta burst stimulation*) vGluT-vezikularni glutamatni transporter 1 (eng. *vesicular glutamate transporter*); GLAST- transporter ekscitatornih amino-kiselina 1 (eng. *glutamate aspartate transporter*); GLT-1-transporter ekscitatornih amino-kiselina 2 (eng. *glutamate transporter*); BDNF-neurotrofični faktor moždanog porekla (eng. *brain derived neurotrophic factor*); GFAP - glijalni fibrilarni kiseli protein (eng. *glial fibrillary acidic protein*)

Šematizovane imunohistochemijske promene Kod mladih životinja registrovano je povećanje ekspresije vGluT-1 u regionu motorne kore nakon višekratne primene kTBS protokola, dok je višekratna primena iTBS dovela do povećanja ekspresije ovog transportera u strijatumu, hipokampusu, kao i malom mozgu mladih pacova (slika V 1.1). Međutim, kod adultnih životinja samo u motornoj kori višekratni iTBS smanjio je ekspresiju vGluT1 (slika V 1.1a; $p < 0,01$), dok u ostalim strukturama mozga nema razlike u obrtu glutamata u

neuronima jer u nijednoj od ispitivanih struktura nije registrovana promena nivoa ekspresije *vGluT1* nakon višekratne primene obe vrste protokola.

S obzirom na neophodnost brzog uklanjanja sinaptički oslobođenog glutamata u regionu malog mozga, glijalni transporteri u Bergmanovoj gliji imaju veoma važnu ulogu u održavanju funkcionalnog odnosa između puzajućih vlakana i Purkinje ćelija. Ovaj podatak je neobično važan za cerebelarnu kontrolu motorne funkcije koja se ostvaruje preko GABA-ergičkih izlaza Purkinje ćelija (Takayasu i sar., 2005). Purkinje ćelije GABA-ergičkih izlaznih projekcija su visoko zavisne od sinaptičke efikasnosti glutamata i njegovog uklanjanja iz sinapse. Smanjena ekspresija *vGluT1* ($p < 0,001$) u kori velikog mozga nakon višekratne primene *iTBS* protokola kod adultnih životinja (slika V 1.1d) ukazuje na smanjenu gustinu glutamata u ekscitatornim sinaptičkim terminalima i potencijalno preusmeravanje ovih molekula ka GABA sintezi, pošto je glutamat jedini direktni prekursor stvaranja GABA (Volz i sar., 2013).

U motornoj kori kod mladih životinja registrovano je povećanje ekspresije *GLAST* (slika V 1.2a) nakon višekratne primene obe vrste protokola (*iTBS*, $p < 0,05$; *kTBS*, $p < 0,001$) u odnosu na placebo životinje. Kod adultnih pacova pronađena je smanjena ekspresija *vGluT1* nakon višekratne stimulacije *iTBS* u odnosu na placebo grupu. Poznato je da se menja molekularni sastav sinapsi prefrontalnog korteksa kod pacova u toku razvoja mozga (Counotte i sar., 2010). Razlika u ekspresiji proteina je najizraženija između P34-P78 (35%), sa prekomernom zastupljenošću proteina ćelijske membrane u toku adolescentskog perioda (P34-P44), kao i proteina sinaptičkih vezikula u periodu između P44-P78. Kritični period u razvoju sinapsi prefrontalnog korteksa je u periodu između P34-P44 kada se vrši diferencijalna ekspresija brojnih proteina (14%). Ove promene su najizraženije kod mladih životinja u motornoj kori, jer je ona uključena u integraciju sensorimotornih procesa i izvršnu kontrolu, koja je neophodna za kompletnu povezanost sa drugim regionima mozga u toku razvoja. Takođe je pokazano da u prefrontalnom korteksu dolazi do smanjenja broja neurona kod mladih i adultnih životinja (Markham i sar., 2007). Razvijen korteks sadrži sinapse u razvoju i sinapse koje će biti eliminisane, što predstavlja proces sinaptičkog usavršavanja koji čini neurotransmisiju mnogo efikasnijom. Rezultati Counotte i saradnika iz 2010. godine su pokazali da su razvojne promene uglavnom lokalizovane presinaptički, a mnogo manje postsinaptički. Specifične razvojne promene u motornoj kori obezbeđuju molekularni dokaz za sinaptičko usavršavanje u toku razvoja mozga i ukazuju na razlike u presinaptičkoj funkciji

kod mladih i starih životinja, što može objasniti razlike u ekspresiji glutamatnih transportera u toku različitih stadijuma razvoja.

Višekratna primena obe vrste protokola u regionu hipokampusa (slika V 1.3c; $p < 0,01$) i malog mozga (slika V 1.3d; $p < 0,001$) adultnih pacova smanjuje ekspresiju *GLT-1*, što se u odnosu na povećanje nivoa ovog transportera u istim moždanim strukturama nakon jednokratne stimulacije može objasniti prekondicioniranjem (Murry i sar., 1986). Ovo stanje indukovane tolerancije, kojim se postiže zaštita ćelija izlaganjem subletalnim insultima osigurava se tolerancija prema sledećem letalnom insultu (Dirnagl i sar., 2003). Youssef i saradnici (2001) su pokazali da se tolerancija u mozgu može objasniti aplikacijom električnih stimulusa koje proizvode *LTP*. Redukcija *GLT-1* i *vGluT1* ekspresije nakon višekratne u odnosu na jednokratnu primenu obe vrste protokola u regionu hipokampusa i malog mozga može predstavljati neku vrstu indukovane tolerancije ovih transportera na produženu *TBS* stimulaciju, čime se povećava njihova efikasnost za preuzimanje glutamata iz sinaptičke pukotine i vraćanje u neurone koja premašuje period stimulacije i može imati protektivne efekte na ekscitotoksičnost glutamata (Youssef i sar., 2001).

U toku prve postnatalne nedelje, imunoelektronskom mikroskopijom pokazana je ekspresija *GLT-1* u ćelijskim telima astrocita i procesima u strijatumu, dok 24. postnatalnog dana dolazi do difuzne lokalizacije astrocita (Rothstein i sar., 1994). Studijom je kod adulta utvrđena negativna korelacija ($R = -1,000$, $p < 0,05$) u ekspresiji *GLT-1* između motorne kore i strijatuma nakon višekratne aplikacije *iTBS* protokola (tabela 1).

Radovi pokazuju da je 18. postnatalnog dana imunoreaktivnost *GLT-1* molekula izuzetno visoka u globus palidusu, amigdalama i lateralnom hipotalamusu, nešto slabija reaktivnost u hipokampusu i relativno niska zastupljenost u strijatumu, talamusu i neokorteksu (Furuta A 1997). Sprovedena studija potvrđuje da se i kod adulta održava različita zastupljenost glutamatnog transportera po moždanim regionima. Korelativna analiza pokazala je da postoji negativna korelacija u ekspresiji *GLT-1* u hipokampusu u odnosu na mali mozak adulta nakon višekratne primene *kTBS* protokola (tabela 1).

Efikasnost i morfologija sinapse je u toku TMS stimulacije veoma povezana sa funkcijom astrocita, što ukazuje na njihovu uključenost u posredovanje efekata TMS na sinaptičku strukturu i efikasnost (Croarkin i MacMaster, 2019). Zbog značajne funkcije koju *GFAP* ima u vezikularnom transportu i autofagiji, sinaptičkoj plastičnosti, transportu

glutamata i sintezi glutamina, široko se koristi za procenu aktivnosti različitih tretmana (Middeldorp i Hol, 2011). Međutim, u ovom istraživanju nisu pronađene promene u ekspresiji *GFAP* kod mladih životinja nakon višekratne primene obe vrste protokola ni u jednoj od ispitivanih selektivno osetljivih moždanih struktura, što pokazuje da stimulacija ne dovodi do reaktivacije glije (slika V 1.5). Kod adultnih pacova je registrovana povećana ekspresija *GFAP* u hipokampusu nakon višekratne primene obe vrste protokola (*iTBS*, $p < 0,001$; *KTBS*, $p < 0,05$), odnosno u cerebelumu nakon *iTBS* stimulacije u odnosu na placebo grupu (slika V 1.5). Ovi rezultati pokazuju bezbednost primene protokola kod mladih životinja, što se može koristiti u zdravoj humanoju populaciji za poboljšanje funkcija koordinacije i oporavak u toku motornih aktivnosti. U skladu sa dobijenim rezultatima su i radovi Liebetanz i saradnika (Liebetanz i sar., 2003) koji su pokazali da nema promena u broju *GFAP*-pozitivnih ćelija u motornoj kori i hipokampusu kod zdravih pacova nakon primene protokola 1000 pulseva od 1Hz dnevno u trajanju od 5 dana. Iako su studije pokazale dobru translaciju sinaptičke starosti vizuelnog korteksa između ljudi i pacova, brojni su izazovi za aplikaciju modela na humanoju populaciji. Glodari i ljudi pokazuju čak 75% podudarnosti genske ortološke osobine (Church i sar., 2009), pa ipak neznatne razlike u genomu otežavaju translaciju i ekstrapolaciju rezultata (Geerts, 2009).

Interesantni rezultati dobijeni su nakon višekratne primene *KTBS* protokola u regionu moždane kore kod adulta gde je bila očekivana kolokalizacija glutamatnih transportera (*GLAST* i *GLT-1*) sa astrocitima koji su predominantno glija-specifični transporteri (Gegelashvili i sar., 1997). Međutim, rezultati korelativne analize ove studije pokazali su u motornoj kori postojanje negativne korelacije između ekspresije *GLAST* i *GFAP* ($R = -0,999$, $p < 0,05$), odnosno *GLT-1* i *GFAP* ($R = -0,998$, $p < 0,05$) kod adultnih životinja nakon višestruke aplikacije *KTBS* protokola (tabela 1).

Studije pokazuju da je *BDNF* protein u visokim koncentracijama detektovan u regionu hipokampusa, hipotalamusa, korteksa i cerebeluma, gde je vizualizovan u dendritima, somi i terminalima (Murer i sar., 2001). Iako postoji veliko preklapanje između *iRNK* i nivoa proteina u većini moždanih regiona, *BDNF* se može transportovati (anterogradno ili retrogradno) u druge regione ili skladištiti u vezikule i odmah osloboditi. U radu su registrovane promene *BDNF* u motornoj kori (slika V 1.4a; $p < 0,05$) i cerebelumu (slika V 1.4d; $p < 0,001$) nakon *KTBS* protokola kod mladih životinja. Pored veoma važnih funkcija pro-*BDNF* u promociji apoptoze i negativnom uticaju na neuronsko remodelovanje,

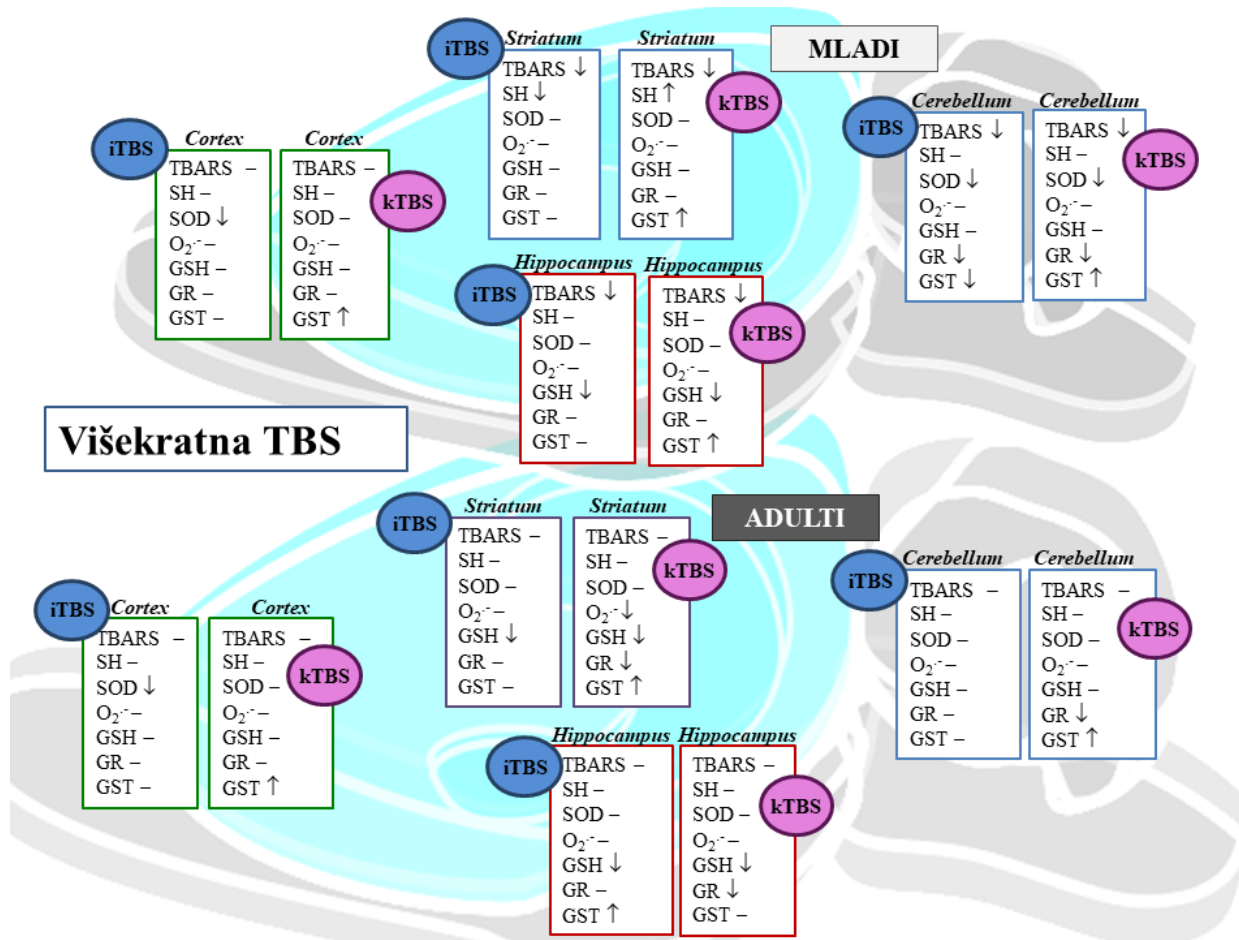
pokazano je i povlačenje konusa rasta i skupljanje dendritskih spina (Gehler i sar., 2004), tako da zbog redukcije broja neurona i smanjenja sinaptičke funkcije, ovi procesi učestvuju u *LTD*. Već je pomenuto da niskofrekventni *kTBS* protokol dovodi do fenomena koji odgovara *LTD*, tako da je u regionu motorne kore i cerebeluma ova vrsta stimulacije dovela do smanjenja ekspresije *BDNF* u odnosu na placebo grupu kod mladih životinja. Fiziološki značaj ovih negativnih procesa može biti objašnjen redukcijom prevelikog broja zrelih neurona, eliminacijom oštećenih multifunkcionalnih ćelija, kao i eliminacijom abnormalnih veza koje su neefikasne za formiranje sinaptičke plastičnosti, memorije i kognicije.

2.2. Biohemijske promene kod višekratno tretiranih životinja

Podaci o biohemijskim promenama u moždanim strukturama nakon višekratne aplikacije rTMS oskudni su i malobrojni. Promene aktivnosti u delovima humanog mozga zasnivaju se na metaboličkim ispitivanjima- praćenju potrošnje kiseonika i glukoze (Blazey i sar., 2018). Ispitivanja na životinjama nemaju apsolutnu vrednost, ali su korisna sa aspekta procene bezbednosti primene rTMS u zdravoj populaciji (Lu i Lu, 2018).

Na slici VI 5 su šematizovano prikazane biohemijske promene kod mladih i adultnih životinja koje su bile višekratno, tokom 10 dana tretirani *iTBS* i *kTBS* protokolima u odnosu na kontrolnu (placebo) grupu životinja.

Višekratni tretmani mladih životinja *iTBS* i *kTBS* protokolom, u strijatumu, hipokampusu i cerebelumu, doveli su do sličnih promena kao i nakon njihovog jednokratnog delovanja- smanjenja *TBARS* (slika V 2.1.b,c,d). Za razliku od jednokratnog delovanja, gde oba tipa *TBS* dovode do smanjenja koncentracije *TBARS* nakon *iTBS/kTBS*, kod višekratne primene oba tretmana *TBARS* su smanjeni kod mladih životinja i nepromenjeni kod adultnih pacova (slika V 2.1a). Ovi rezultati upućuju na očuvanost lipidnih membrana u odnosu na potencijalno delovanje reaktivnih vrsta i nadalje, nakon višekratnog delovanja *iTBS/kTBS*.



Slika VI 6. Šematizovan prikaz promena biohemijskih parametara kod mladih i adultnih životinja u selektivno osetljivim strukturama mozga višekratno tretiranih obrascima intermitentne i kontinuirane TBS

iTBS-intermitentna stimulacija teta praskovima (eng. *intermittent theta burst stimulation*); kTBS-kontinuirana stimulacija teta praskovima (eng. *continuous theta burst stimulation*); TBARS-tiobarbiturna kiselina-reagujućih supstanci (eng. *thiobarbituric acid reactive species*); SH-sulfhidrilne grupe; SOD-superoksid dizmutaza; O₂^{•-}-superoksid anjon radikala; GSH-redukovani glutation; GR-glutation reduktaza; GST-glutation-S-transferaza

Na osnovu promena u sadržaju SH grupa u moždanim strukturama, može se zaključiti da višekratna primena iTBS u moždanoj kori, hipokampusu i cerebelumu ne narušava funkciju i strukturu proteina koji u svom sastavu imaju SH grupe (slika V 2.4a,c,d), ali da su oni molekuli “napadnuti” u strijatumu, u kome se nakon višekratne primene ovog protokola registruje smanjenje SH grupa (slika V 2.4b).

Poredeći ovakve promene sa promenama koje su registrovane kod mladih životinja koje su jednokratno tretirane protokolom iTBS, može se uočiti izostanak izrazito povoljnog zaštitnog efekta jednokratne primene tretmana na SH grupe. Kod višekratnog delovanja na

mlade životinje dakle, destruktivni efekat (smanjenje SH) registruje se u strijatumu, dok se kod ostalih struktura vrednosti SH grupa zadržavaju na normalnim vrednostima. U ovoj strukturi, višekratna aplikacija *iTBS* ne menja druge parametre- stvaranje superoksida (slika V 2.2b), aktivnosti enzima SOD (slika V 2.3b), GR (slika V 2.6b) i GST (slika V 2.7b), a i koncentracija GSH je nepromenjena u odnosu na kontrolu (slika V 2.5b). Strijatum se dakle još jednom izdvaja kao osetljiva struktura na delovanje slobodnih kiseoničnih radikala tokom delovanja *iTBS*. Objašnjenje leži u činjenici da je strijatum mesto gde *iTBS* stimulacija uzrokuje prolongirano povećanje cAMP, što utiče na ćelijsku diferencijaciju i pojačano preuzimanje ekstracelularnog glutamata (Schubert i sar., 2000).

Za razliku od višekratnog *iTBS* tretmana, višekratna primena *kTBS* dovodi do povećanja SH grupa u strijatumu, što je promena koja se ne registruje u strijatumu mladih, jednokratno tretiranih životinja (slika V 2.4b). U strijatumu mladih višekratno tretiranih *kTBS* protokolom se javlja povećanje aktivnosti GST (slika V 2.7b), što je potpuno različito od jednokratnog delovanja *kTBS*, kada je nađena čak smanjena aktivnost ovog enzima. Višekratno delovanje *kTBS* na podsticaj promena sličnih *LTD*, u strijatumu očigledno ima povoljan efekat na redoks stanje tkivnih struktura. Višekratno aplikovan intermitentni obrazac *TBS* međutim, pored toga što štiti ćelijske membrane od LPO, ne ispoljava zaštitni efekat na proteine, naprotiv, narušava ih.

Značajni efekat višekratno aplikovanog *iTBS* kod mladih životinja registruje se kroz smanjenje aktivnosti SOD u moždanoj kori i cerebelumu (slika V 2.3a,d).

Za razliku od korteksa mladih životinja u kome su GSH, GR, GST nakon višekratne primene *iTBS* nepromenjeni, u cerebelumu se, pored smanjene aktivnosti SOD registruje i smanjenje aktivnosti GR (slika V 2.6d; $p < 0,001$) i GST (slika V 2.7d; $p < 0,05$). Sve ove promene međutim ne vode tkivne strukture kore i cerebeluma u stanje oksidativnog stresa, što se ne registruje ni u hipokampusu mladih životinja koje su višekratno tretirane *iTBS* protokolom. U ovoj strukturi beleži se smanjenje GSH (slika V 2.5c; $p < 0,01$), uz nepromenjenu aktivnost enzima GR (slika V 2.6c) i GST (slika V 2.7c). Glutation je ključan unutarćelijski antioksidans koji štiti aktivne SH grupe molekula od uticaja slobodnoradikalnih vrsta (Gu i sar., 2015), ali GSH može da vrši i ulogu ekscitatornog neurotransmitera (Morris i sar., 2014). Uprkos njegovom smanjenju, u hipokampusu se ne nalaze potvrde aktivnog oksidativnog stresa- *TBARS* i sadržaj SH grupa su nepromenjeni, što

upućuje na pretpostavku da je ovo smanjenje GSH upravo pokazatelj njegove zaštitne funkcije, odnosno da su se na račun smanjenja GSH očuvale SH grupe.

Višekratna aplikacija *kTBS* kod mladih životinja nije narušila oksidativno stanje u bilo kojoj od analiziranih moždanih struktura- SH grupe su nepromenjene u kori, hipokampusu i cerebelumu (slika V 2.4a, c, d), dok su u strijatumu čak povećane (slika V 2.4b). Interesantno je da se kod jednokratne aplikacije *kTBS* kod mladih životinja registruje povećanje SH grupa u svim strukturama uz izuzetak strijatuma u kome su SH grupe nepromenjene, dok se kod višekratne aplikacije *kTBS* mladim životinjama dobijaju vrednosti povećanih SH grupa. Ovim se potvrđuje povoljan efekat višekratnog delovanja *kTBS* na strijatum mladih životinja.

Pored direktne funkcije tripeptida glutationa u presretanju slobodnih radikala, on ima bitnu funkciju kofaktora u izoenzimskim oblicima glutation peroksidaze. U odnosu na druga tkiva, nervno tkivo ima znatno manju aktivnost ovog enzima koji obezbeđuje zaštitu od peroksida. Sa druge strane, moždano tkivo ima visok stepen iskorišćavanja kiseonika, a stvoreni peroksidi se formiraju i od strane aminooksidaza, kao i iz reakcije TPNH-oksidaza sa masnim kiselinama membranskih fosfolipida. Moždano tkivo je posebno osetljivo na delovanje radikala jer ne poseduje aktivnost peroksidaza i katalaze. Prisustvo većih količina GSH međutim bitan je faktor održanja redoks balansa. Glutation reduktaza održava GSH predominantno u svojoj redukovanoj formi (De Marchena i sar., 1974).

Pored zaštitne, antioksidantne funkcije, GSH može da ispoljava i funkciju neurotransmitera. Vezujuća mesta za GSH pokazana su u moždanoj kori glodara (Janaky i sar., 1999). Predominantna mesta zaliha GSH predstavljaju astrociti, dok neuroni ne poseduju značajne rezerve ovog tripeptida. Smatra se da GSH ima funkciju i gliotransmitera pomoću koga se ostvaruje komunikacija astrocita sa neuronima (Orellana, 2016).

Višekratna aplikacija *iTBS* i *kTBS* kod adultnih životinja nije narušila redoks milje lipidnih i proteinskih struktura analiziranih moždanih regiona. Lipidna peroksidacija je neizmenjena (slika V 2.1), a nisu registrovane ni promene u sadržaju SH grupa (slika V 2.4). U odnosu na ove krajnje proizvode oksidativnog oštećenja može se reći da oba *TBS* protokola ne ispoljavaju destruktivne efekte na lipidne strukture i proteine.

Višekratna primena *iTBS* odraslim životinjama međutim u strijatumu i hipokampusu izaziva značajno smanjenje GSH (slika V 2.5b, c) što se ne beleži u moždanoj kori i

cerebelumu (slika V 2.5a, d). Smanjen sadržaj GSH u hipokampusu registruje se i kod mladih životinja tretiranih višekratno *iTBS* protokolom, ali se kod adulta taj efekat proširuje i na strijatum, upućujući još jednom na selektivnu vulnerabilnost ove strukture na oksidativno oštećenje. Aktivnosti enzima SOD i GR u ovim strukturama ostaju nepromenjene (slika V 2.3b,c; slika V 2.6b,c), kao ni produkcija superoksida (slika V 2.2b,c). Za razliku od strijatuma, u kome je aktivnost GST nepromenjena (slika V 2.7 b), u hipokampusu se aktivnost ovog enzima povećava (slika V 2.7 c; $p < 0,05$). Sa jedne strane, podaci iz literature govore u prilog činjenici da se promene u strijatumu povećavaju sa starenjem, dok je takođe poznato da nivo GSH kao jednog od najmoćnijih antioksidanata i regulator drugih antioksidanata, značajno opada u toku procesa starenja. Razlog oštećenja antioksidativnog sistema jeste povećani unos polinezasićenih i delimično hidrogenizovanih biljnih masti i preterana izloženosti toksičnim supstancama (Naganuma i sar., 1990).

Za razliku od strijatuma i hipokampusu u kojima nema promene aktivnosti SOD, GR i GST, višekratna primena *iTBS* kod adultnih životinja u moždanoj kori i malom mozgu smanjuje aktivnost SOD (slika V 2.3a,d). U moždanoj kori i cerebelumu GR (slika V 2.6a,d) i GST (slika V 2.7a,d) ostaju nepromenjeni. Takođe, u odnosu na kontrolu, neizmenjena je i koncentracija GSH (slika V 2.5 a,d), kao i produkcija superoksida (slika V 2.2a,d).

Ovakvi podaci upućuju na operativnu antioksidativnu odbranu koja održava redoks milje lipida i proteina u svim analiziranim strukturama, uz manje promene koje se dominantno registruju na strijatumu i hipokampusu.

Višekratna aplikacija *kTBS* kod adultnih životinja, pored očuvanih nivoa kontrolne LPO i sadržaja SH grupa, ni u jednoj od analiziranih struktura ne povećava nivo stvorenog superoksida. Štaviše, u strijatumu dovodi do njegovog smanjenja (slika V 2.2b; $p < 0,05$). Opet je strijatum struktura u kojoj se najviše ispoljavaju promene- nasuprot smanjenju stvaranja superoksida, koncentracija GSH opada (slika V 2.5b; $p < 0,001$), a opada i aktivnost GR (slika V 2.6.b; $p < 0,05$), enzima koji regeneriše GSH. U ovoj strukturi se sa druge strane registruje povećanje aktivnosti GST (slika V 2.7b). U hipokampusu se pak promena aktivnosti GST ne beleži (slika V 2.7c), premda se i u ovoj strukturi javlja smanjenje aktivnosti GR (slika V 2.6c) i smanjena koncentracija GSH (slika V 2.5c). Smanjena aktivnost GR u ovoj strukturi upravo može biti razlog smanjenja redukovano glutationa.

Moždana kora i cerebellum su, premda direktnije izloženi delovanju *kTBS* tokom višekratnih tretmana, otporniji na promene. Pored neizmenjenih *TBARS* (slika V 2.1a,d) i SH (slika V 2.4a,d), nema promene u stvaranju superoksida (slika V 2.2a,d), ne menja se aktivnost enzima SOD (slika V 2.3a,d), a nema promene ni u sadržaju GSH (slika V 2.5a,d).

Analizirajući promene koje su prikazane na šemama, stiče se utisak da jednokratna primena *TBS* deluje promotivno, dovodeći čak do unapređenog redoks stanja u selektivno osetljivim moždanim strukturama životinja, dok višekratno delovanje *TBS* ne menja bitno redoks stanje u odnosu na oksidativne promene u lipidima i proteinima.

VI 3. Međustarosne razlike u tkivnim parametrima

Ispitivanje *TBS* (i drugih protokola TMS) na malim životinjama je otežano zbog nemogućnosti precizne selektivne stimulacije regiona mozga, jer i dalje ne postoji adekvatno tehničko rešenje za problem veličine kalema za stimulaciju, pošto su komercijalno dostupni kalemi konstruisani za upotrebu u humanoj populaciji. Ova globalna stimulacija mozga tj. aktiviranje brojnih interneuronskih grupa, različitih neuronskih mreža i komunikacija između različitih regiona mozga možda je razlog odsustva razlike u pojedinim strukturama pri jednokratnom i višekratnom stimulanju adultnih jedinki.

U istraživanju se u grupi mladih životinja višekratno tretiranih *iTBS* registruje povećana ekspresija *vGluT-1* u strijatumu, hipokampusu i malom mozgu (slika V 1.1b,c,d; $p < 0,001$). Ovaj podatak govori u prilog činjenici da se ekscitatorni efekat *TBS* ostvaruje povećanom produkcijom transportera i posledično većim oslobađanjem Glu u sinaptičku pukotinu. Interesantno je da ovo očekivano povećanje ekspresije *vGluT-1* u istoj grupi izostaje u motornoj kori, a da u grupi adulta, višekratno tretiranih istim protokolom čak dolazi do smanjenja ekspresije transportera (slika V 1.1a). Obzirom da se ove dve grupe životinja u sprovedenim eksperimentalnim uslovima razlikuju isključivo u nedeljama starosti, uzrok ovog smanjenja može biti nedovoljna adaptacija presinaptičkih neurona starijih životinja na pojačanu ekscitacijsku stimulaciju. Smanjena ekspresija *vGluT-1* u motornoj kori nakon jednokratne *kTBS* u grupi adulta, govori u prilog tome da ovaj protokol izaziva smanjenje kortikalne ekscitabilnosti, što je potvrđeno ispitivanjem Volz-a i saradnika, koji su takođe registrovali smanjenje ekspresije ovog transportera kod pacova koji su primili 600 pulseva po protokolu *kTBS* (Volz i sar., 2013). Porast ekspresije *vGluT-1* u motornoj kori nakon *kTBS*

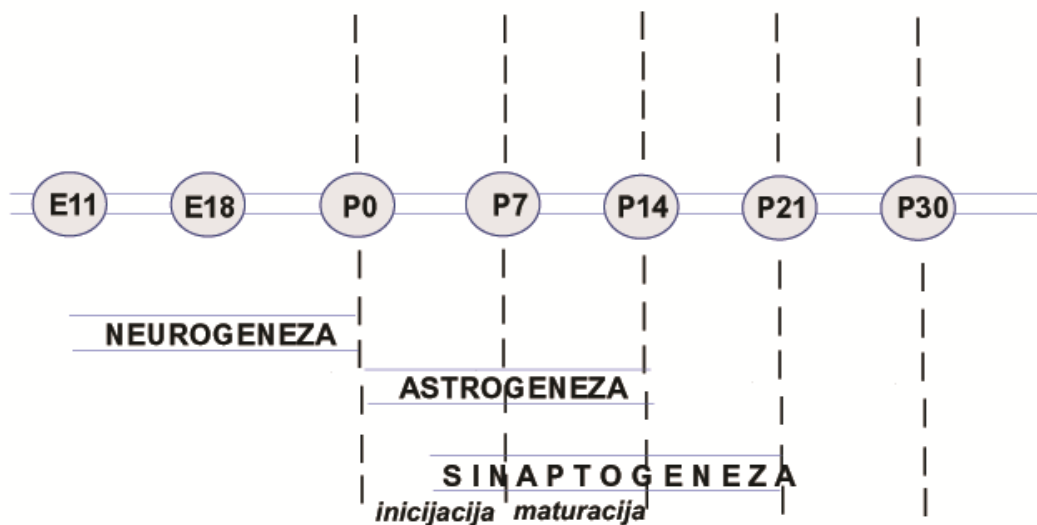
kod višekratno tretiranih mladih životinja može biti posledica razlike u metabolizmu i sazrevanju neuronskih mehanizama između mladih i odraslih jedinki.

Poređenjem višekratno u odnosu na jednokratno tretirane mlade životinje, dobijena je manja ekspresija transportera *vGluT-1* u svim strukturama mozga nakon primene oba protokola, osim u hipokampusu gde je snižena ekspresija ovog molekula detektovana samo nakon *kTBS* protokola (slika V 1.1). Identičnim poređenjem u grupama adulta, ekspresija transportera je niža nakon oba protokola u hipokampusu, i u motornoj kori samo nakon *iTBS*. Ova manja ekspresija vezikularnog transportera nakon višekratne stimulacije *iTBS* može upravo biti posledica pauza između aplikacija (dva dana), kada dolazi do povećanja otpornosti sinapse na ponovljenu stimulaciju. Smanjenje ekspresije transportera u svim strukturama nakon višekratnog *kTBS* odgovara osnovnoj paradigmi da *kTBS* dovodi do inhibitornih efekata, i da se oni održavaju više dana nakon poslednje stimulacije.

Ekspresija *vGluT-1* u grupi mladih životinja višekratno tretiranih *kTBS* u poređenju sa adultima je snižena u svim strukturama, a u motornoj kori i nakon *iTBS*. Ovakav podatak može da govori u prilog tome da starije životinje imaju sniženi kapacitet adaptacije na dugotrajnu inhibiciju jer se sa starenjem snižava prag za otpornost prema ekscitotoksičnosti koja je direktna protivteža inhibitornom uticaju *kTBS* (Camandola i Mattson, 2017).

Na osnovu literaturnih podataka poznato je da u toku druge i treće nedelje sinaptičke diferencijacije predominantno dolazi do ekspresije *vGluT-1* transportera (De Gois i sar., 2005). Endogena regulacija u toku razvoja i homeostatska kontrola ekspresije transportera u toku funkcionalne diferencijacije učestvuje sa jedne strane u kontroli vezikularnog transportera za glutamat, odnosno *GABA* sa druge strane, čime se podešava presinaptički ekscitatorno/inhibitorni balans. U motornoj kori mladih životinja pronađena je negativna korelacija ($R = -0.967$, $p < 0,05$) u ekspresiji *vGluT-1* između jednokratne i višekratne aplikacije *kTBS* protokola, što govori u prilog promena u transportu glutamata zavisno od broja ponavljanja istog protokola (tabela 1).

Astroцити регулишу sinapse preko direktnih kontakata i sekrecijom solubilnih faktora koji ciljaju pre- i postsinaptička mesta, jer utiču na modulaciju strukture i funkcije ekscitatornih i inhibitornih sinapsi (Farhy-Tselnicker i Allen, 2018). Ovo vodi konceptu "tripartitne sinapse" koja se sastoji od dva neurona i astrocita kao funkcionalne jedinice.



Slika VI 6. Put od neurogeneze do sinaptogeneze preko astrogeneze

Razvoj korteksa kod glodara počinje stvaranjem neurona i njihovih populacija u korteksu pre samog rođenja. Nakon toga se stvaraju astrociti što počinje rođenjem i nastavlja se u toku dve postnatalne nedelje. Na kraju, astrociti učestvuju u formiranju sinapse koja se stvara u toku prve dve postnatalne nedelje, tj. istovremeno sa stvaranjem i maturacijom astrocita. Kod mladih životinja jednokratna primena oba protokola dovodi do povećanja ekspresije *GFAP* u odnosu na višekratnu stimulaciju u regionu motorne kore (slika V 1.5a; *iTBS*, $p < 0,01$; *kTBS*, $p < 0,05$). Chaudhry i saradnici su 1995. godine vizualizovali neke od specifičnih proteina u astrocitima u blizini sinapse (*GLAST*, *GLT-1*), čime su obezbedili mogućnost korišćenja ovih markera za astrocitni deo tripartitne sinapse (Chaudhry i sar., 1995). Ovi podaci su u skladu sa sprovedenim istraživanjem jer je u regionu motorne kore jednokratna primena *iTBS* protokola dovela do povećanja ekspresije *GLAST*, *GLT-1* i *GFAP* u odnosu na višekratnu *iTBS* kod mladih životinja (slike V 1.2a, V 1.3a, V 1.5a). Nakamura i saradnici su 2005. godine pokazali imunoreaktivnost *vGluT1* transportera koji markira presinaptičke terminale ekscitatornih kortikalnih neurona sa nešto nižom ekspresijom na rođenju, ali sa postojanim povećanjem u toku maturacije. Rezultati ove studije potvrđuju iznete činjenice jer je u svim ispitivanim strukturama mozga višekratna primena *kTBS* protokola dovela do niže ekspresije *vGluT1* kod mladih u odnosu na adultne životinje (slika V 1.1) (Nakamura i sar., 2005). Morel i saradnici su 2014. godine na *knockout* životinjama za *vGluT1* u korteksu pokazali da postoji slabiji kontakt između astrocita i sinapsi što sugerise sveobuhvatnu ulogu ovih procesa u glutamatoj signalizaciji (Morel i sar., 2014).

Brojne uloge astrocita u CNS-u su već naglašene, između ostalih održavanje moždane ekstracelularne jonske homeostaze (Catalani i sar., 2002), migracija i maturacija neurona (Bezzi i sar., 2001) sinteza i preuzimanje neurotransmitera (Inazu i sar., 2001) i mogućnost skladištenja energije u formi glikogena (Magistretti i sar., 1993). Sa kliničkog aspekta, astroglijalne ćelije su uključene u održavanje integriteta tkiva nakon oštećenja mozga (Garcia-Segura LM, 1999) i modulaciju sinaptičke funkcije na osnovu ponašanja (Bacci i sar., 1999). U tom smislu, hipokampus je moždani region koji ima osnovnu ulogu u prostornom učenju i memoriji. U toku razvoja mozga, hipokampus je glavni target za gonadalne steroide, hormone uključene u seksualnu diferencijaciju (Burgess i Hi a, 1993). Astrociti i neuroni vrše ekspresiju receptora za gonadalne hormone (Gasc i Baulieu, 1986). Promene u ekspresiji *GFAP*, molekula uključenog u održavanje morfologije astrocita, opisane su u dentatnom girusu iz hipokampusa pacova sa estrusnim ciklusom (Hajos i sar., 2000). Nixdorf-Bergweiler i saradnici su 1994. godine pokazali da se u CA1 sektoru hipokampusa ne menja samo morfologija, već i broj *GFAP*-imunoreaktivnih astrocita u toku prve dve nedelje nakon rođenja (Nixdorf-Bergweiler i sar., 1994). To je u skladu sa dobijenim rezultatima ovog rada gde su korišćene životinje veće starosti (mlade P28 i adulti P56) u kojima nisu registrovane značajne promene u ekspresiji komponente intermedijernog filameta (*GFAP*) u regionu hipokampusa nakon jednokratne i višekratne primene obe vrste stimulacije (*iTBS*, *kTBS*). Verovatni razlog neizmenjene astroglijalne populacije u hipokampalnim presecima je završen postnatalni razvoj u kome su astrociti ključni za razvoj sinaptičke plastičnosti u hipokampusu (Laming i sar., 2000). *GFAP* imunoreaktivni astrociti su u ranom postnatalnom razvoju specifično uključeni u razvoj neuronskih veza preko procesa *LTP* u hipokampalnim sinapsama (McCall i sar., 1996).

Kod adultnih životinja, višekratna primena *iTBS* protokola dovela je do povećanja ekspresije *GFAP* molekula u svim ispitivanim strukturama mozga u odnosu na mlade pacove (slika V 1.5). Već je pomenuto da proces starenja uzrokuje brojne promene u osobinama ćelija (Souza, 2015). Pored činjenice da je cerebralna homeostaza veoma usko kontrolisan proces, u toku starenja osnovne karakteristike ovog sistema mogu postati disfunkcionalne. Uloga glija ćelija u ovom sistemu je od izuzetnog značaja jer je uloga astrocita dokazana u regulaciji homeostaze neurotransmitera, energetske metabolizmu, antioksidativnoj zaštiti i anti-inflamatornom odgovoru. Kao važni astrocitni marker, *GFAP* je povezan sa procesom migracije i proliferacije, transportom glutamata i sintezom glutamina (Middeldorp i Hol,

2011). U tom smislu, rezultati pokazuju da višekratna primena *iTBS* protokola kod adulta povećava ekspresiju ovog molekula što je zavisno od starosti jedinke i razlikuje se u odnosu na mlade životinje.

Za razliku od drugih neurotrofina, *BDNF* utiče na preživljavanje mnogih tipova neurona u CNS i PNS (Lindholm i sar., 1993). U regionu motorne kore pacova nakon višekratne primene *iTBS* registrovana je veća ekspresija *BDNF* kod mladih za razliku od starih životinja (slika V 1.4a; $p < 0,01$). Ovi rezultati su u skladu sa podacima koje su dobili Katoh-Semba i saradnici (1997) o smanjenju *iRNK* za *BDNF* u toku procesa starenja. Njihovi rezultati takođe pokazuju da je *iRNK* za *BDNF* visoko koncentrisana u mozgu pacova, naročito kod adultnih životinja, kao i da je široko distribuisana u različitim regionima mozga (Katoh-Semba i sar., 1997).

Najvažnija uloga različitih izoformi *BDNF* u toku razvoja mozga, vezana je za procese neuro-, glio- i sinaptogeneze, regulaciju ćelijske smrti i eliminaciju neadekvatno formiranih veza (Kowianski i sar., 2018). Pozitivni i negativni uticaji koje *BDNF* izoforme ispoljavaju u kontroli dinamičkog balansa su neobično važni za održavanje fiziološke homeostaze. Dodatni faktori, kao što su stadijum razvoja mozga, struktura mozga, ciljne ćelijske populacije i faktori sredine, su takođe od značaja u ovom tipu regulacije. Odnos između *proBDNF* i *mBDNF* izoformi se razlikuje između različitih faza razvoja mozga, kao i različitih moždanih regiona. Morel i saradnici su 2014. godine pokazali da su u ranom postnatalnom periodu registrovane veće koncentracije *pro-BDNF*, dok je *m-BDNF* prevashodno dominantan kod adulta (Morel i sar., 2014). *Pro-BDNF* je važan u modulaciji moždanih funkcija, posebno u toku razvoja, dok *m-BDNF* pokazuje izuzetan značaj u procesima koji se dešavaju kod adulta, kao što su neuroprotekcija i sinaptička plastičnost. Kako u istraživanju nisu korišćene životinje sa velikom razlikom u stepenu starosti (4 i 8 nedelja), dobijeni rezultati nisu pokazali velike varijacije u ekspresiji *BDNF* u ispitivanim strukturama mozga nakon primene obe vrste *TBS* stimulacije (slika V 1.4).

Izoforna *m-BDNF* učestvuje u procesima razvoja neuro- i gliogeneze (Vilar i Mira, 2016), rasta neurita, dendritske arborizacije i formiranju dendritskih spina (Encinas i sar., 1999). Fiziološki efekti *m-BDNF* su uglavnom povezani sa održavanjem sinaptičke snage i smanjenjem ekscitabilnosti hipokampalnih *GABA*-ergičkih interneurona, zajedno sa povećanjem *LTP* (Leal i sar., 2015). Kod adultnih životinja je jednokratna u odnosu na

višekratnu *iTBS* stimulaciju, koja uzrokuje fenomene slične *LTP*, dovela do povećanja *BDNF* ekspresije u regionu malog mozga (slika V 1.4d; $p < 0,05$). Ovi rezultati pokazuju da je povećana ekspresija *BDNF* u vezi sa povećanjem razvojnih procesa kod adulta, koji su mnogo intenzivniji nakon jednokratne primene *iTBS* i za koje je potrebna veća moždana aktivnost i transmisija stimulusa u sinaptičkom sistemu. Kowiański i saradnici su 2018. godine pokazali da je povećana ekspresija *BDNF* sa jedne strane rezultat stimulacije, dok sa druge strane visok nivo *BDNF* jača sinaptičku potencijaciju, moduliše akso-dendritsku morfologiju i pozitivno utiče na neuronsku aktivnost (Kowianski i sar., 2018).

VII ZAKLJUČCI

1. Jednokratna primena protokola intermitentne *TBS* ni kod mladih, ni kod adultnih pacova ne dovodi do promena u ekspresiji vezikularnog transportera *vGluT* u moždanoj kori, strijatumu, hipokampusu i malom mozgu.
2. Višekratno primenjeni, protokoli intermitentne *TBS* kod mladih pacova povećavaju ekspresiju vezikularnog transportera *vGluT* u strijatumu, hipokampusu i cerebelumu, dok primena ovog protokola kod adulta dovodi do smanjenja ekspresije *vGluT* u moždanoj kori.
3. Jednokratno primenjen protokol intermitentne *TBS* dovodi do povećanja ekspresije membranskih transportera *GLAST* u hipokampusu i malom mozgu mladih pacova, dok se u selektivno osetljivim moždanim strukturama adultnih životinja ne menja ekspresija ovog transportera.
4. Višekratno primenjen protokol intermitentne *TBS* dovodi do povećanja ekspresije membranskog transportera *GLAST* u moždanoj kori mladih pacova, dok se u hipokampusu njegova ekspresija smanjuje.
5. Višekratna primena protokola intermitentne *TBS* dovodi do smanjenja ekspresije *GLT-1* u hipokampusu i cerebelumu adultnih životinja, dok se kod mladih životinja ekspresija ovog transportera ne menja.
6. Jednokratna primena intermitentne *TBS* kod mladih pacova dovodi do smanjenja ekspresije *BDNF* u hipokampusu, dok višekratna primena ovog protokola izaziva smanjenje ekspresije *BDNF* u moždanoj kori.
7. Kod adultnih životinja, ni jednokratna, ni višekratna primena intermitentnog i kontinuiranog protokola na menja ekspresiju *BDNF* u selektivno osetljivim moždanim strukturama
8. Višekratno primenjeni, protokoli intermitentne *TBS* kod mladih pacova ne menjaju ekspresiju *GFAP* u selektivno osetljivim strukturama, dok kod adultnih pacova povećavaju ekspresiju *GFAP* u hipokampusu i malom mozgu.
9. Jednokratna primena kontinuirane *TBS* kod adultnih pacova dovodi do smanjenja ekspresije vezikularnog transportera *vGluT* u moždanoj kori, dok

višekratna primena ovog protokola povećava ekspresiju ovog transportera u moždanoj kori mladih životinja.

10. Jednokratno primenjen protokol kontinuirane *TBS* kod mladih pacova dovodi do smanjenja *GLAST* u hipokampusu i njegovog povećanja u cerebelumu, dok kod adultnih pacova dovodi do povećanja ekspresije *GLAST* u hipokampusu i cerebelumu.

11. Višektano primenjen protokol kontinuirane *TBS* kod mladih pacova dovodi do povećanja ekspresije *GLAST* u moždanoj kori i strijatumu, dok se kod adultnih životinja ekspresija ovog transportera ne menja.

12. Jednokratna primena protokola kontinuirane *TBS* kod adultnih životinja povećava ekspresiju transportera *GLT-1* u malom mozgu, dok ga u moždanoj kori i strijatumu smanjuje.

13. Višekratna primena protokola kontinuirane *TBS* kod adultnih životinja smanjuje ekspresiju transportera *GLT-1* u hipokampusu i cerebelumu, dok se kod mladih životinja ne menja ekspresija ovog transportera.

14. Jednokratna primena kontinuirane *TBS* kod mladih pacova dovodi do povećanja ekspresije *BDNF* u cerebelumu, dok višekratna primena ovog *TBS* protokola izaziva smanjenje ekspresije *BDNF* u moždanoj kori i malom mozgu.

15. Višekratna primena protokola intermitentne *TBS* ne izaziva destruktivne promene oksidativnog stanja u selektivno osetljivim moždanim strukturama adultnih životinja.

16. Jednokratna primena protokola intermitentne *TBS* ne povećava lipidnu peroksidaciju u selektivno osetljivim moždanim strukturama, ali povećava oksidativno oštećenje proteina u strijatumu adultnih životinja.

17. U selektivno osetljivim moždanim strukturama mladih životinja ni jednokratna ni višekratna primena protokola intermitentne i kontinuirane *TBS* ne izazivaju stanje oksidativnog stresa.

VIII LITERATURA

- Abbott, N.J., Ronnback, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7, 41-53.
- Allaman, I., Belanger, M., Magistretti, P.J., 2011. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci* 34, 76-87.
- Anderson, M.E., Meister, A., 1983. Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 707-711.
- Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Starkov, A.A., 2005. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 70, 200-214.
- Aoyama, K., Nakaki, T., 2013. Neuroprotective properties of the excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). *Amino Acids* 45, 133-142.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55, 373-399.
- Arai, N., Okabe, S., Furubayashi, T., Mochizuki, H., Iwata, N.K., Hanajima, R., Terao, Y., Ugawa, Y., 2007. Differences in after-effect between monophasic and biphasic high-frequency rTMS of the human motor cortex. *Clin Neurophysiol* 118, 2227-2233.
- Arias-Carrion, O., 2008. Basic mechanisms of rTMS: Implications in Parkinson's disease. *Int Arch Med* 1, 2.
- Atlante, A., Calissano, P., Bobba, A., Giannattasio, S., Marra, E., Passarella, S., 2001. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress i mitochondria. *FEBS Lett* 497, 1-5.
- Auclair C., V.E., 1985. Nitroblue tetrazolium reduction, In: RA, G. (Ed.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, Florida, pp. 123-132.
- Ayala, A., Munoz, M.F., Arguelles, S., 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014, 360438.
- Bacci, A., Verderio, C., Pravettoni, E., Matteoli, M., 1999. The role of glial cells in synaptic function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354, 403-409.
- Baluchnejadmojarad, T., Eftekhari, S.M., Jamali-Raeufy, N., Haghani, S., Zeinali, H., Roghani, M., 2017. The anti-aging protein klotho alleviates injury of nigrostriatal dopaminergic pathway in 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease: Involvement of PKA/CaMKII/CREB signaling. *Exp Gerontol* 100, 70-76.
- Bannai, S., Sato, H., Ishii, T., Taketani, S., 1991. Enhancement of glutathione levels in mouse peritoneal macrophages by sodium arsenite, cadmium chloride and glucose/glucose oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1092, 175-179.

- Barker, A.T., Jalinous, R., Freeston, I.L., 1985. Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. *Lancet* 1, 1106-1107.
- Bear, M.F., 1996. A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13453-13459.
- Belanger, M., Magistretti, P.J., 2009. The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci* 11, 281-295.
- Benarroch, E.E., 2010. Glutamate transporters: diversity, function, and involvement in neurologic disease. *Neurology* 74, 259-264.
- Bender, V.A., Pugh, J.R., Jahr, C.E., 2009. Presynaptically expressed long-term potentiation increases multivesicular release at parallel fiber synapses. *J Neurosci* 29, 10974-10978.
- Bezzi, P., Domercq, M., Vesce, S., Volterra, A., 2001. Neuron-astrocyte cross-talk during synaptic transmission: physiological and neuropathological implications. *Prog Brain Res* 132, 255-265.
- Binder, D.K., Scharfman, H.E., 2004. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22, 123-131.
- Blazey, T., Snyder, A.Z., Goyal, M.S., Vlassenko, A.G., Raichle, M.E., 2018. A systematic meta-analysis of oxygen-to-glucose and oxygen-to-carbohydrate ratios in the resting human brain. *PLoS One* 13, e0204242.
- Bliss, T.V., Lomo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 331-356.
- Bramham, C.R., 2008. Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Curr Opin Neurobiol* 18, 524-531.
- Brigelius-Flohe, R., 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27, 951-965.
- Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M.L., 2010. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med* 15, 186-190.
- Burgess, L.H., Handa, R.J., 1993. Hormonal regulation of androgen receptor mRNA in the brain and anterior pituitary gland of the male rat. *Brain Res Mol Brain Res* 19, 31-38.
- Camandola, S., Mattson, M.P., 2017. Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *EMBO J* 36, 1474-1492.
- Castro-Alamancos, M.A., Calcagnotto, M.E., 1999. Presynaptic long-term potentiation in corticothalamic synapses. *J Neurosci* 19, 9090-9097.

Catala, A., 2006. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1482-1495.

Catalani, A., Sabbatini, M., Consoli, C., Cinque, C., Tomassoni, D., Azmitia, E., Angelucci, L., Amenta, F., 2002. Glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in developing rat hippocampus. *Mech Ageing Dev* 123, 481-490.

Cederberg, H.H., Uhd, N.C., Brodin, B., 2014. Glutamate efflux at the blood-brain barrier: cellular mechanisms and potential clinical relevance. *Arch Med Res* 45, 639-645.

Chaudhry, F.A., Lehre, K.P., van Lookeren Campagne, M., Ottersen, O.P., Danbolt, N.C., Storm-Mathisen, J., 1995. Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15, 711-720.

Chen, H.X., Jiang, M., Akakin, D., Roper, S.N., 2009. Long-term potentiation of excitatory synapses on neocortical somatostatin-expressing interneurons. *J Neurophysiol* 102, 3251-3259.

Cherian, M.G., Kang, Y.J., 2006. Metallothionein and liver cell regeneration. *Exp Biol Med (Maywood)* 231, 138-144.

Cheung, Z.H., Ip, N.Y., 2007. The roles of cyclin-dependent kinase 5 in dendrite and synapse development. *Biotechnol J* 2, 949-957.

Chou, Y.H., Hickey, P.T., Sundman, M., Song, A.W., Chen, N.K., 2015. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on motor symptoms in Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Neurol* 72, 432-440.

Chouinard, P.A., Van Der Werf, Y.D., Leonard, G., Paus, T., 2003. Modulating neural networks with transcranial magnetic stimulation applied over the dorsal premotor and primary motor cortices. *J Neurophysiol* 90, 1071-1083.

Church, D.M., Goodstadt, L., Hillier, L.W., Zody, M.C., Goldstein, S., She, X., Bult, C.J., Agarwala, R., Cherry, J.L., DiCuccio, M., Hlavina, W., Kapustin, Y., Meric, P., Maglott, D., Birtle, Z., Marques, A.C., Graves, T., Zhou, S., Teague, B., Potamou, K., Churas, C., Place, M., Herschleb, J., Runnheim, R., Forrest, D., Amos-Li graf, J., Schwartz, D.C., Cheng, Z., Lindblad-Toh, K., Eichler, E.E., Ponting, C.P., 2009. Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol* 7, e1000112.

Counotte, D.S., Li, K.W., Wortel, J., Gouwenberg, Y., Van Der Schors, R.C., Smit, A.B., Spijker, S., 2010. Changes in molecular composition of rat medial prefrontal cortex synapses during adolescent development. *Eur J Neurosci* 32, 1452-1460.

Couto, N., Wood, J., Barber, J., 2016. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med* 95, 27-42.

Croarkin, P.E., MacMaster, F.P., 2019. Transcranial Magnetic Stimulation for Adolescent Depression. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 28, 33-43.

Cruz, D.A., Eggan, S.M., Lewis, D.A., 2003. Postnatal development of pre- and postsynaptic GABA markers at chandelier cell connections with pyramidal neurons in monkey prefrontal cortex. *J Comp Neurol* 465, 385-400.

Cullen, C.L., Young, K.M., 2016. How Does Transcranial Magnetic Stimulation Influence Glial Cells in the Central Nervous System? *Front Neural Circuits* 10, 26.

Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65, 1-105.

Dasari, S., Ganjavi, M.S., Meriga, B., 2018. Glutathione S-transferase is a good biomarker in acrylamide induced neurotoxicity i genotoxicity. *Interdiscip Toxicol* 11, 115-121.

De Gois, S., Schafer, M.K., Defamie, N., Chen, C., Ricci, A., Weihe, E., Varoqui, H., Erickson, J.D., 2005. Homeostatic scaling of vesicular glutamate i GABA transporter expression in rat neocortical circuits. *J Neurosci* 25, 7121-7133.

De Marchena, O., Guarnieri, M., McKhann, G., 1974. Glutathione peroxidase levels in brain. *J Neurochem* 22, 773-776.

Deng, Z.D., Lisanby, S.H., Peterchev, A.V., 2013. Electric field depth-focality tradeoff in transcranial magnetic stimulation: simulation comparison of 50 coil designs. *Brain Stimul* 6, 1-13.

Di Simplicio, P., Franconi, F., Frosali, S., Di Giuseppe, D., 2003. Thiolation and nitrosation of cysteines in biological fluids i cells. *Amino Acids* 25, 323-339.

Diamond, D.M., Dunwiddie, T.V., Rose, G.M., 1988. Characteristics of hippocampal primed burst potentiation in vitro and in the awake rat. *J Neurosci* 8, 4079-4088.

Dickinson, D.A., Forman, H.J., 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64, 1019-1026.

Dirnagl, U., Simon, R.P., Hallenbeck, J.M., 2003. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 26, 248-254.

Dong, X.X., Wang, Y., Qin, Z.H., 2009. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* 30, 379-387.

Doretto, S., Malerba, M., Ramos, M., Ikrar, T., Kinoshita, C., De Mei, C., Tirota, E., Xu, X., Borrelli, E., 2011. Oligodendrocytes as regulators of neuronal networks during early postnatal development. *PLoS One* 6, e19849.

Đukić, M.M., 2008. Oksidativni stres: slobodni radikali, prooksidansi, antioksidansi. *Mono i Manjana*.

Dumas, T.C., 2012. Postnatal alterations in induction threshold and expression magnitude of long-term potentiation and long-term depression at hippocampal synapses. *Hippocampus*. 22, 188-199.

Dvorzhak, A., Melnick, I., Grantyn, R., 2018. Astrocytes and presynaptic plasticity in the striatum: Evidence and unanswered questions. *Brain Res Bull* 136, 17-25.

Eiserich, J.P., Patel, R.P., O'Donnell, V.B., 1998. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med* 19, 221-357.

El Mestikawy, S., Wallen-Mackenzie, A., Fortin, G.M., Descarries, L., Trudeau, L.E., 2011. From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci* 12, 204-216.

Elman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.

Encinas, M., Iglesias, M., Llecha, N., Comella, J.X., 1999. Extracellular-regulated kinases and phosphatidylinositol 3-kinase are involved in brain-derived neurotrophic factor-mediated survival and neuritogenesis of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Neurochem* 73, 1409-1421.

Fagali, N., Catala, A., 2009. Fe²⁺ i Fe³⁺ initiated peroxidation of sonicated and non-sonicated liposomes made of retinal lipids in different aqueous media. *Chem Phys Lipids* 159, 88-94.

Fahnestock, M., Marchese, M., Head, E., Pop, V., Michalski, B., Milgram, W.N., Cotman, C.W., 2012. BDNF increases with behavioral enrichment and an antioxidant diet in the aged dog. *Neurobiol Aging* 33, 546-554.

Farhy-Tselnicker, I., Allen, N.J., 2018. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural Dev* 13, 7.

Finkel, T., 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 194, 7-15.

Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.

Fitzgerald, P.B., Fountain, S., Daskalakis, Z.J., 2006. A comprehensive review of the effects of rTMS on motor cortical excitability and inhibition. *Clin Neurophysiol* 117, 2584-2596.

Foltran, R.B., Diaz, S.L., 2016. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? *J Neurochem* 138, 204-221.

Fontana, A.C., 2015. Current approaches to enhance glutamate transporter function and expression. *J Neurochem* 134, 982-1007.

Freneau, R.T., Jr., Kam, K., Qureshi, T., Johnson, J., Copenhagen, D.R., Storm-Mathisen, J., Chaudhry, F.A., Nicoll, R.A., Edwards, R.H., 2004. Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science* 304, 1815-1819.

Fukai, T., Ushio-Fukai, M., 2011. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 15, 1583-1606.

Funke, K., Benali, A., 2011. Modulation of cortical inhibition by rTMS - findings obtained from animal models. *J Physiol* 589, 4423-4435.

Furness, D.N., Dehnes, Y., Akhtar, A.Q., Rossi, D.J., Hamann, M., Grutle, N.J., Gundersen, V., Holmseth, S., Lehre, K.P., Ullensvang, K., Wojewodzic, M., Zhou, Y., Attwell, D., Danbolt, N.C., 2008. A quantitative assessment of glutamate uptake into hippocampal synaptic terminals and astrocytes: new insights into a neuronal role for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Neuroscience* 157, 80-94.

Furuta A , R.J.D., Martin L J, 1997. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci Res* 17, 8363-8375.

Gamboa, O.L., Antal, A., Laczó, B., Moliadze, V., Nitsche, M.A., Paulus, W., 2011. Impact of repetitive theta burst stimulation on motor cortex excitability. *Brain Stimul* 4, 145-151.

Garcia-Segura LM, N.F., Hutchison JB, Azcoitia I, Chowen JA, 1999. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol* 40, 574-584.

Gasc, J.M., Baulieu, E.E., 1986. Steroid hormone receptors: intracellular distribution. *Biol Cell* 56, 1-6.

Geerts, H., 2009. Of mice and men: bridging the translational disconnect in CNS drug discovery. *CNS Drugs* 23, 915-926.

Gegelashvili, G., Danbolt, N.C., Schousboe, A., 1997. Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia. *J Neurochem* 69, 2612-2615.

Gehler, S., Shaw, A.E., Sarmiere, P.D., Bamburg, J.R., Letourneau, P.C., 2004. Brain-derived neurotrophic factor regulation of retinal growth cone filopodial dynamics is mediated through actin depolymerizing factor/cofilin. *J Neurosci* 24, 10741-10749.

George, M.S., Lisanby, S.H., Avery, D., McDonald, W.M., Durkalski, V., Pavlicova, M., Anderson, B., Nahas, Z., Bulow, P., Zarkowski, P., Holtzheimer, P.E., 3rd, Schwartz, T., Sackeim, H.A., 2010. Daily left prefrontal transcranial magnetic stimulation therapy for major depressive disorder: a sham-controlled randomized trial. *Arch Gen Psychiatry* 67, 507-516.

George Paxinos, C.W., 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Elsevier, p. 209.

Gilio, F., Conte, A., Vanacore, N., Frasca, V., Inghilleri, M., Berardelli, A., 2007. Excitatory and inhibitory after-effects after repetitive magnetic transcranial stimulation (rTMS) in normal subjects. *Exp Brain Res* 176, 588-593.

Girotti, M.J., Khan, N., McLellan, B.A., 1991. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma* 31, 32-35.

- Gomes, F.C., Paulin, D., Moura Neto, V., 1999. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res* 32, 619-631.
- Goto, H., Watanabe, K., Araragi, N., Kageyama, R., Tanaka, K., Kuroki, Y., Toyoda, A., Hattori, M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Fukumaki, Y., Shibata, H., 2009. The identification and functional implications of human-specific "fixed" amino acid substitutions in the glutamate receptor family. *BMC Evol Biol* 9, 224.
- Griffith, O.W., 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 27, 922-935.
- Gu, F., Chauhan, V., Chauhan, A., 2015. Glutathione redox imbalance in brain disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 18, 89-95.
- Gurd, J.W., Jones, L.R., Mahler, H.R., Moore, W.J., 1974. Isolation and partial characterization of rat brain synaptic plasma membranes. *J Neurochem* 22, 281-290.
- Hacioglu, G., Senturk, A., Ince, I., Alver, A., 2016. Assessment of oxidative stress parameters of brain-derived neurotrophic factor heterozygous mice in acute stress model. *Iran J Basic Med Sci* 19, 388-393.
- Hajos, F., Halasy, K., Gerics, B., Szalay, F., Michaloudi, E., Papadopoulos, G.C., 2000. Ovarian cycle-related changes of glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in the rat interpeduncular nucleus. *Brain Res* 862, 43-48.
- Hallett, M., 2007. Transcranial magnetic stimulation: a primer. *Neuron* 55, 187-199.
- Halliwell, B., 1996. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans* 24, 1023-1027.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1985. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med* 8, 89-193.
- Harward, S.C., Hedrick, N.G., Hall, C.E., Parra-Bueno, P., Milner, T.A., Pan, E., Laviv, T., Hempstead, B.L., Yasuda, R., McNamara, J.O., 2016. Autocrine BDNF-TrkB signalling within a single dendritic spine. *Nature* 538, 99-103.
- Hasey, G., 2001. Transcranial magnetic stimulation in the treatment of mood disorder: a review and comparison with electroconvulsive therapy. *Can J Psychiatry* 46, 720-727.
- Hebb, D.O., 1949. *The organization of behavior*. Wiley & Sons, New York.
- Hernández-Espinosa, D.R., Massieu, L., Montiel, T., Moran, J., 2019. Role of NADPH oxidase-2 in the progression of the inflammatory response secondary to striatum excitotoxic damage. *J Neuroinflammation* 16, 91.

Hnasko, T.S., Edwards, R.H., 2012. Neurotransmitter corelease: mechanism and physiological role. *Annu Rev Physiol* 74, 225-243.

Hofer, M., Pagliusi, S.R., Hohn, A., Leibrock, J., Barde, Y.A., 1990. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J* 9, 2459-2464.

Holmseth, S., Dehnes, Y., Huang, Y.H., Follin-Arbelet, V.V., Grutle, N.J., Mylonakou, M.N., Plachez, C., Zhou, Y., Furness, D.N., Bergles, D.E., Lehre, K.P., Danbolt, N.C., 2012. The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS. *J Neurosci* 32, 6000-6013.

Hoogendam, J.M., Ramakers, G.M., Di Lazzaro, V., 2010. Physiology of repetitive transcranial magnetic stimulation of the human brain. *Brain Stimul* 3, 95-118.

Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24, 677-736.

Huang, Y.Y., Kiehl, E.R., 1998. Postsynaptic induction and PKA-dependent expression of LTP in the lateral amygdala. *Neuron* 21, 169-178.

Huang, Y.Z., Chen, R.S., Rothwell, J.C., Wen, H.Y., 2007. The after-effect of human theta burst stimulation is NMDA receptor dependent. *Clin Neurophysiol* 118, 1028-1032.

Huang, Y.Z., Edwards, M.J., Rounis, E., Bhatia, K.P., Rothwell, J.C., 2005. Theta burst stimulation of the human motor cortex. *Neuron* 45, 201-206.

Huganir, R.L., Nicoll, R.A., 2013. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron* 80, 704-717.

Inazu, M., Takeda, H., Ikoshi, H., Sugisawa, M., Uchida, Y., Matsumiya, T., 2001. Pharmacological characterization and visualization of the glial serotonin transporter. *Neurochem Int* 39, 39-49.

Jahanshahi, M., Rothwell, J., 2000. Transcranial magnetic stimulation studies of cognition: an emerging field. *Exp Brain Res* 131, 1-9.

Janaky, R., Ogita, K., Pasqualotto, B.A., Bains, J.S., Oja, S.S., Yoneda, Y., Shaw, C.A., 1999. Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS. *J Neurochem* 73, 889-902.

Janssen-Heininger, Y.M., Mossman, B.T., Heintz, N.H., Forman, H.J., Kalyanaraman, B., Finkel, T., Stamler, J.S., Rhee, S.G., van der Vliet, A., 2008. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic Biol Med* 45, 1-17.

Jeremy M. Henley, K.A.W., 2013. AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging. *Dialogues Clin Neurosci*. 15, 11-27.

Jin, X.T., Smith, Y., 2011. Localization and functions of kainate receptors in the basal ganglia. *Adv Exp Med Biol* 717, 27-37.

Juarez-Rebollar, D., Rios, C., Nava-Ruiz, C., Mendez-Armenta, M., 2017. Metallothionein in Brain Disorders. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 5828056.

Jung, S.H., Shin, J.E., Jeong, Y.S., Shin, H.I., 2008. Changes in motor cortical excitability induced by high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation of different stimulation durations. *Clin Neurophysiol* 119, 71-79.

Jupp, B., Caprioli, D., Saigal, N., Reverte, I., Shrestha, S., Cumming, P., Everitt, B.J., Robbins, T.W., Dalley, J.W., 2013. Dopaminergic and GABA-ergic markers of impulsivity in rats: evidence for anatomical localisation in ventral striatum and prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 37, 1519-1528.

Kalinina, E.V., Chernov, N.N., Aleud, R., Novichkova, M.D., Saprin, A.N., Berezov, T.T., 2010. [Current views on antioxidative activity of glutathione and glutathione-depending enzymes]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*, 46-54.

Kalinina, E.V., Chernov, N.N., Novichkova, M.D., 2014. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry (Mosc)* 79, 1562-1583.

Katoh-Semba, R., Takeuchi, I.K., Semba, R., Kato, K., 1997. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and it's changes with development in the brain. *J Neurochem* 69, 34-42.

Khan, M.Z., 2016. Ionotropic glutamate receptors (iGluRs) of the delta family (GluD1 and GluD2) and synaptogenesis. *Alexi ria Journal of Medicine*.

Kim, D.S., Kwak, S.E., Kim, J.E., Won, M.H., Choi, H.C., Song, H.K., Kwon, O.S., Kim, Y.I., Choi, S.Y., Kang, T.C., 2005. Bilateral enhancement of excitation via up-regulation of vesicular glutamate transporter subtype 1, not subtype 2, immunoreactivity in the unilateral hypoxic epilepsy model. *Brain Res* 1055, 122-130.

Kowianski, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waskow, M., Steliga, A., Morys, J., 2018. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol* 38, 579-593.

Kruidenier, L., Verspaget, H.W., 2002. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther* 16, 1997-2015.

Krzyzanowska, W., Pomierny, B., Filip, M., Pera, J., 2014. Glutamate transporters in brain ischemia: to modulate or not? *Acta Pharmacol Sin* 35, 444-462.

Kurosaki, H., Yamaguchi, K., Man-Yoshi, K., Muramatsu, S.I., Hara, S., Ichinose, H., 2019. Administration of tetrahydrobiopterin restored the decline of dopamine in the striatum induced by an acute action of MPTP. *Neurochem Int* 125, 16-24.

- L. B. Drobot, A.A.S., A. V. Vorotnikov, P. A. Tyurin -Kuzmin,, A. V. Bazalii, T.K., V. A. Tkachuk, S. V. Komisarenko, 2013. Reactive oxygen species in signal transduction. Укр. біохім. журн. 85.
- Laming, P.R., Kimelberg, H., Robinson, S., Salm, A., Hawrylak, N., Muller, C., Roots, B., Ng, K., 2000. Neuronal-glia interactions and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 24, 295-340.
- Larson, J., Jessen, R.E., Kim, D., Fine, A.K., du Hoffmann, J., 2005. Age-dependent and selective impairment of long-term potentiation in the anterior piriform cortex of mice lacking the fragile X mental retardation protein. *J Neurosci* 25, 9460-9469.
- Lau, A., Tymianski, M., 2010. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch* 460, 525-542.
- Lazarov, O., Mattson, M.P., Peterson, D.A., Pimplikar, S.W., van Praag, H., 2010. When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends Neurosci* 33, 569-579.
- Lazo, O.M., Gonzalez, A., Ascano, M., Kuruvilla, R., Couve, A., Bronfman, F.C., 2013. BDNF regulates Rab11-mediated recycling endosome dynamics to induce dendritic branching. *J Neurosci* 33, 6112-6122.
- Leal, G., Afonso, P.M., Salazar, I.L., Duarte, C.B., 2015. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain Res* 1621, 82-101.
- Lee, J.Y., Kim, S.H., Ko, A.R., Lee, J.S., Yu, J.H., Seo, J.H., Cho, B.P., Cho, S.R., 2013. Therapeutic effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in an animal model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1537, 290-302.
- Lenhossek, M., 1891. Zur Kenntnis der Neuroglia des menschlichen Rückenmarkes. . *Verh. Anat. Ges.*, 193–221.
- Lewerenz, J., Maher, P., 2015. Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence? *Front Neurosci* 9, 469.
- Liebetanz, D., Fauser, S., Michaelis, T., Czeh, B., Watanabe, T., Paulus, W., Frahm, J., Fuchs, E., 2003. Safety aspects of chronic low-frequency transcranial magnetic stimulation based on localized proton magnetic resonance spectroscopy i histology of the rat brain. *J Psychiatr Res* 37, 277-286.
- Lindenberg, R., Renga, V., Zhu, L.L., Nair, D., Schlaug, G., 2010. Bihemispheric brain stimulation facilitates motor recovery in chronic stroke patients. *Neurology* 75, 2176-2184.
- Lindholm, D., Dechant, G., Heisenberg, C.P., Thoenen, H., 1993. Brain-derived neurotrophic factor is a survival factor for cultured rat cerebellar granule neurons and protects them against glutamate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 5, 1455-1464.
- Linguz-Leczna, M., Skagiel-Kramska, J., 2007. Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): The three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiol. Exp.* 67, 207-218.

- Liu, P.Z., Nusslock, R., 2018. Exercise-Mediated Neurogenesis in the Hippocampus via BDNF. *Front Neurosci* 12, 52.
- Ljubisavljevic, M.R., Javid, A., Oommen, J., Parekh, K., Nagelkerke, N., Shehab, S., Adrian, T.E., 2015. The Effects of Different Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) Protocols on Cortical Gene Expression in a Rat Model of Cerebral Ischemic-Reperfusion Injury. *PLoS One* 10, e0139892.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Ri all, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Lu, B., Pang, P.T., Woo, N.H., 2005. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6, 603-614.
- Lu, S.C., 2013. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1830, 3143-3153.
- Lu, Y.W., Lu, M., 2018. Comparison of Induced Fields in Virtual Human and Rat Heads by Transcranial Magnetic Stimulation. *Biomed Res Int* 2018, 5270279.
- Luber, B., Kinnunen, L.H., Rakitin, B.C., Ellsasser, R., Stern, Y., Lisanby, S.H., 2007. Facilitation of performance in a working memory task with rTMS stimulation of the precuneus: frequency- and time-dependent effects. *Brain Res* 1128, 120-129.
- Ma, J., Zhang, Z., Su, Y., Kang, L., Geng, D., Wang, Y., Luan, F., Wang, M., Cui, H., 2013. Magnetic stimulation modulates structural synaptic plasticity and regulates BDNF-TrkB signal pathway in cultured hippocampal neurons. *Neurochem Int* 62, 84-91.
- Machtens, J.P., Kortzak, D., Lansche, C., Leinenweber, A., Kilian, P., Begemann, B., Zachariae, U., Ewers, D., de Groot, B.L., Briones, R., Fahlke, C., 2015. Mechanisms of anion conduction by coupled glutamate transporters. *Cell* 160, 542-553.
- Magistretti, P.J., Sorg, O., Yu, N., Martin, J.L., Pellerin, L., 1993. Neurotransmitters regulate energy metabolism in astrocytes: implications for the metabolic trafficking between neural cells. *Dev Neurosci* 15, 306-312.
- Makani, R., Pradhan, B., Shah, U., Parikh, T., 2017. Role of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) in Treatment of Addiction and Related Disorders: A Systematic Review. *Curr Drug Abuse Rev* 10, 31-43.
- Markham, J.A., Morris, J.R., Juraska, J.M., 2007. Neuron number decreases in the rat ventral, but not dorsal, medial prefrontal cortex between adolescence and adulthood. *Neuroscience* 144, 961-968.
- Marlatt, M.W., Potter, M.C., Lucassen, P.J., van Praag, H., 2012. Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice. *Dev Neurobiol* 72, 943-952.

- Marosi, K., Mattson, M.P., 2014. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab* 25, 89-98.
- Matthew A Olude , O.A.M., Oluwatunde A Aderounmu , James O Olopade , Amadi O Ihunwo 2015. Astrocyte morphology, heterogeneity, and density in the developing African giant rat (*Cricetomys gambianus*) *Front Neuroanat* 26.
- Mattson, M.P., 2008. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1144, 97-112.
- Mc Cutcheon J.E., M.M., 2009. Age matters. *Eur J Neurosci* 29, 997-1014.
- McCall, M.A., Gregg, R.G., Behringer, R.R., Brenner, M., Delaney, C.L., Galbreath, E.J., Zhang, C.L., Pearce, R.A., Chiu, S.Y., Messing, A., 1996. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6361-6366.
- McKimm, E., Corkill, B., Goldowitz, D., Albritton, L.M., Homayouni, R., Blaha, C.D., Mittleman, G., 2014. Glutamate dysfunction associated with developmental cerebellar damage: relevance to autism spectrum disorders. *Cerebellum* 13, 346-353.
- Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., Sharma, P.L., 2013. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 698, 6-18.
- Meredith, R.M., Floyer-Lea, A.M., Paulsen, O., 2003. Maturation of long-term potentiation induction rules in rodent hippocampus: role of GABAergic inhibition. *J Neurosci* 23, 11142-11146.
- Merton, P.A., Morton, H.B., 1980. Stimulation of the cerebral cortex in the intact human subject. *Nature* 285, 227.
- Middeldorp, J., Hol, E.M., 2011. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93, 421-443.
- Mironczuk-Chodakowska, I., Witkowska, A.M., Zujko, M.E., 2018. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci* 63, 68-78.
- Misra, R.R., Hochadel, J.F., Smith, G.T., Cook, J.C., Waalkes, M.P., Wink, D.A., 1996. Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein. *Chem Res Toxicol* 9, 326-332.
- Morel, L., Higashimori, H., Tolman, M., Yang, Y., 2014. VGluT1+ neuronal glutamatergic signaling regulates postnatal developmental maturation of cortical protoplasmic astroglia. *J Neurosci* 34, 10950-10962.
- Morris, G., Anderson, G., Dean, O., Berk, M., Galecki, P., Martin-Subero, M., Maes, M., 2014. The glutathione system: a new drug target in neuroimmune disorders. *Mol Neurobiol* 50, 1059-1084.

- Mukherjee, S., Manahan-Vaughan, D., 2013. Role of metabotropic glutamate receptors in persistent forms of hippocampal plasticity and learning. *Neuropharmacology* 66, 65-81.
- Munster-Wandowski, A., Zier, J.F., Richter, K., Ahnert-Hilger, G., 2016. Co-existence of Functionally Different Vesicular Neurotransmitter Transporters. *Front Synaptic Neurosci* 8, 4.
- Murer, M.G., Yan, Q., Raisman-Vozari, R., 2001. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 63, 71-124.
- Murry, C.E., Jennings, R.B., Reimer, K.A., 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124-1136.
- Naganuma, A., Ierson, M.E., Meister, A., 1990. Cellular glutathione as a determinant of sensitivity to mercuric chloride toxicity. Prevention of toxicity by giving glutathione monoester. *Biochem Pharmacol* 40, 693-697.
- Nakamura, K., Hioki, H., Fujiyama, F., Kaneko, T., 2005. Postnatal changes of vesicular glutamate transporter (VGluT)1 i VGluT2 immunoreactivities and their colocalization in the mouse forebrain. *J Comp Neurol* 492, 263-288.
- Nawa, H., Carnahan, J., Gall, C., 1995. BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mRNA levels. *Eur J Neurosci* 7, 1527-1535.
- Netto, L.E., de Oliveira, M.A., Monteiro, G., Demasi, A.P., Cussiol, J.R., Discola, K.F., Demasi, M., Silva, G.M., Alves, S.V., Faria, V.G., Horta, B.B., 2007. Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146, 180-193.
- Nicoletti, F., Bockaert, J., Collingridge, G.L., Conn, P.J., Ferraguti, F., Schoepp, D.D., Wroblewski, J.T., Pin, J.P., 2011. Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* 60, 1017-1041.
- Ninković M, S.I., Perić P, 2017. Osnove ćelijske neurofiziologije. Medija centar odbrana, .
- Nixdorf-Bergweiler, B.E., Albrecht, D., Heinemann, U., 1994. Developmental changes in the number, size, i orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. *Glia* 12, 180-195.
- Noh, N.A., Fuggetta, G., Manganotti, P., Fiaschi, A., 2012. Long lasting modulation of cortical oscillations after continuous theta burst transcranial magnetic stimulation. *PLoS One* 7, e35080.
- Oni-Orisan, A., Kristiansen, L.V., Haroutunian, V., Meador-Woodruff, J.H., McCullumsmith, R.E., 2008. Altered vesicular glutamate transporter expression in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 63, 766-775.

- Opie, G.M., Vosnakis, E., Ridding, M.C., Ziemann, U., Semmler, J.G., 2017. Priming theta burst stimulation enhances motor cortex plasticity in young but not old adults. *Brain Stimul* 10, 298-304.
- Orellana, J.A., 2016. Physiological Functions of Glial Cell Hemichannels. *Adv Exp Med Biol* 949, 93-108.
- Orth, A., Tapken, D., Hollmann, M., 2013. The delta subfamily of glutamate receptors: characterization of receptor chimeras and mutants. *Eur J Neurosci* 37, 1620-1630.
- Papadopoulos, M.C., Koumenis, I.L., Dugan, L.L., Giffard, R.G., 1997. Vulnerability to glucose deprivation injury correlates with glutathione levels in astrocytes. *Brain Res* 748, 151-156.
- Parke, D.V., Sapota, A., 1996. Chemical toxicity and reactive oxygen species. *Int J Occup Med Environ Health* 9, 331-340.
- Parris M, K.P., 1997. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Altern. Med. Rev.* 2, 155-176.
- Pascual-Leone, A., Bartres-Faz, D., Keenan, J.P., 1999. Transcranial magnetic stimulation: studying the brain-behaviour relationship by induction of 'virtual lesions'. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354, 1229-1238.
- Paus, T., Zijdenbos, A., Worsley, K., Collins, D.L., Blumenthal, J., Giedd, J.N., Rapoport, J.L., Evans, A.C., 1999. Structural maturation of neural pathways in children and adolescents: in vivo study. *Science* 283, 1908-1911.
- Pell, G.S., Roth, Y., Zangen, A., 2011. Modulation of cortical excitability induced by repetitive transcranial magnetic stimulation: influence of timing and geometrical parameters and underlying mechanisms. *Prog Neurobiol* 93, 59-98.
- Pirazzini, M., Azarnia Tehran, D., Zanetti, G., Megighian, A., Scorzeto, M., Fillo, S., Shone, C.C., Binz, T., Rossetto, O., Lista, F., Montecucco, C., 2014. Thioredoxin and its reductase are present on synaptic vesicles, and their inhibition prevents the paralysis induced by botulinum neurotoxins. *Cell Rep* 8, 1870-1878.
- Rabey, J.M., Dobronevsky, E., Aichenbaum, S., Gonen, O., Marton, R.G., Khaigrekht, M., 2013. Repetitive transcranial magnetic stimulation combined with cognitive training is a safe and effective modality for the treatment of Alzheimer's disease: a randomized, double-blind study. *J Neural Transm (Vienna)* 120, 813-819.
- Radka, S.F., Holst, P.A., Fritsche, M., Altar, C.A., 1996. Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a vulnerable and specific immunoassay. *Brain Res* 709, 122-301.

- Razavi, S., Nazem, G., Mardani, M., Esfiandari, E., Salehi, H., Esfahani, S.H., 2015. Neurotrophic factors and their effects in the treatment of multiple sclerosis. *Adv Biomed Res* 4, 53.
- Reiter, R.J., 1995. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 9, 526-533.
- Ren, J., Qin, C., Hu, F., Tan, J., Qiu, L., Zhao, S., Feng, G., Luo, M., 2011. Habenula "cholinergic" neurons co-release glutamate and acetylcholine and activate postsynaptic neurons via distinct transmission modes. *Neuron* 69, 445-452.
- Ridding, M.C., Ziemann, U., 2010. Determinants of the induction of cortical plasticity by non-invasive brain stimulation in healthy subjects. *J Physiol* 588, 2291-2304.
- Rizzo, V., Siebner, H.R., Modugno, N., Pesenti, A., Munchau, A., Gerschlager, W., Webb, R.M., Rothwell, J.C., 2004. Shaping the excitability of human motor cortex with premotor rTMS. *J Physiol* 554, 483-495.
- Robbe, D., Kopf, M., Remaury, A., Bockaert, J., Manzoni, O.J., 2002. Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8384-8388.
- Robinson, M.B., Jackson, J.G., 2016. Astroglial glutamate transporters coordinate excitatory signaling and brain energetics. *Neurochem Int* 98, 56-71.
- Rodnight, R., Goncalves, C.A., Wofchuk, S.T., Leal, R., 1997. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Braz J Med Biol Res* 30, 325-338.
- Rodriguez-Perdigon, M., Tordera, R.M., Gil-Bea, F.J., Gerenu, G., Ramirez, M.J., Solas, M., 2016. Down-regulation of glutamatergic terminals (VGLUT1) driven by Abeta in Alzheimer's disease. *Hippocampus* 26, 1303-1312.
- Rose, C.R., Blum, R., Kafitz, K.W., Kovalchuk, Y., Konnerth, A., 2004. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. *Bioessays* 26, 1185-1194.
- Rossi, S., Hallett, M., Rossini, P.M., Pascual-Leone, A., 2009. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clin Neurophysiol* 120, 2008-2039.
- Rothman, S.M., Mattson, M.P., 2013. Activity-dependent, stress-responsive BDNF signaling and the quest for optimal brain health and resilience throughout the lifespan. *Neuroscience* 239, 228-240.
- Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kuncl, R.W., 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13, 713-725.

Sasso, V., Bisicchia, E., Latini, L., Ghiglieri, V., Cacace, F., Carola, V., Molinari, M., Viscomi, M.T., 2016. Repetitive transcranial magnetic stimulation reduces remote apoptotic cell death and inflammation after focal brain injury. *J Neuroinflammation* 13, 150.

Scandalios, J.G., 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38, 995-1014.

Schafer, F.Q., Buettner, G.R., 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30, 1191-1212.

Schneider, N., Cordeiro, S., Machtens, J.P., Braams, S., Rauen, T., Fahlke, C., 2014. Functional properties of the retinal glutamate transporters GLT-1c and EAAT5. *J Biol Chem* 289, 1815-1824.

Schousboe, A., Scafidi, S., Bak, L.K., Waagepetersen, H.S., McKenna, M.C., 2014. Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes. *Adv Neurobiol* 11, 13-30.

Schubert, P., Morino, T., Miyazaki, H., Ogata, T., Nakamura, Y., Marchini, C., Ferroni, S., 2000. Cascading glia reactions: a common pathomechanism and its differentiated control by cyclic nucleotide signaling. *Ann N Y Acad Sci* 903, 24-33.

Shan, D., Lucas, E.K., Drummond, J.B., Haroutunian, V., Meador-Woodruff, J.H., McCullumsmith, R.E., 2013. Abnormal expression of glutamate transporters in temporal lobe areas in elderly patients with schizophrenia. *Schizophr Res* 144, 1-8.

Souza, M.S., 2015. Glutamatergic transmission in drug reward: implications for drug addiction. *Front Neurosci*. 2015 9.

Spear, L., 2000. Modeling adolescent development and alcohol use in animals. *Alcohol Res Health* 24, 115-123.

Spickett, C.M., Wiswedel, I., Siems, W., Zarkovic, K., Zarkovic, N., 2010. Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products. *Free Radic Res* 44, 1172-1202.

Stefanatos, R., Sanz, A., 2018. The role of mitochondrial ROS in the aging brain. *FEBS Lett* 592, 743-758.

Sun, R., Eriksson, S., Wang, L., 2012. Oxidative stress induced S-glutathionylation and proteolytic degradation of mitochondrial thymidine kinase 2. *J Biol Chem* 287, 24304-24312.

Takatsuru, Y., Iino, M., Tanaka, K., Ozawa, S., 2007. Contribution of glutamate transporter GLT-1 to removal of synaptically released glutamate at climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neurosci Lett* 420, 85-89.

Takayasu, Y., Iino, M., Kakegawa, W., Maeno, H., Watase, K., Wada, K., Yanagihara, D., Miyazaki, T., Komine, O., Watanabe, M., Tanaka, K., Ozawa, S., 2005. Differential roles of

glial and neuronal glutamate transporters in Purkinje cell synapses. *J Neurosci* 25, 8788-8793.

Taylor, J.L., Loo, C.K., 2007. Stimulus waveform influences the efficacy of repetitive transcranial magnetic stimulation. *J Affect Disord* 97, 271-276.

Todd, G., Flavel, S.C., Ridding, M.C., 2006. Low-intensity repetitive transcranial magnetic stimulation decreases motor cortical excitability in humans. *J Appl Physiol* (1985) 101, 500-505.

Torres, F.V., Hansen, F., Locks-Coelho, L.D., 2013. Increase of extracellular glutamate concentration increases its oxidation and diminishes glucose oxidation in isolated mouse hippocampus: reversible by TFB-TBOA. *J Neurosci Res* 91, 1059-1065.

Trayhurn, P., van Heyningen, R., 1973. The metabolism of amino acids in the bovine lens. Their oxidation as a source of energy. *Biochem J* 136, 67-75.

Tunez, I., Drucker-Colin, R., Jimena, I., Medina, F.J., Munoz Mdel, C., Pena, J., Montilla, P., 2006. Transcranial magnetic stimulation attenuates cell loss and oxidative damage in the striatum induced in the 3-nitropropionic model of Huntington's disease. *J Neurochem* 97, 619-630.

Ulusu, N.N., Tiogan, B., 2007. Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. *Mol Cell Biochem* 303, 45-51.

van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13, 57-149.

Vandresen-Filho, S., Martins, W.C., Bertoldo, D.B., Mancini, G., De Bem, A.F., Tasca, C.I., 2015. Cerebral cortex, hippocampus, striatum and cerebellum show differential susceptibility to quinolinic acid-induced oxidative stress. *Neurol Sci* 36, 1449-1456.

Verkhatsky, A., Matteoli, M., Parpura, V., Mothet, J.P., Zorec, R., 2016. Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion. *EMBO J* 35, 239-257.

Vigneault, E., Poirel, O., Riad, M., Prud'homme, J., Dumas, S., Turecki, G., Fasano, C., Mechawar, N., El Mestikawy, S., 2015. Distribution of vesicular glutamate transporters in the human brain. *Front Neuroanat* 9, 23.

Vilar, M., Mira, H., 2016. Regulation of Neurogenesis by Neurotrophins during Adulthood: Expected and Unexpected Roles. *Front Neurosci* 10, 26.

Virchow, R., 1858. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. Pathologischen Institut zu Berlin Zwanzig Vorlesungen gehalten während der Monate Februar, März und April 1858

- Volterra, A., Trotti, D., Floridi, S., Racagni, G., 1994. Reactive oxygen species inhibit high-affinity glutamate uptake: molecular mechanism and neuropathological implications. *Ann N Y Acad Sci* 738, 153-162.
- Volz, L.J., Benali, A., Mix, A., Neubacher, U., Funke, K., 2013. Dose-dependence of changes in cortical protein expression induced with repeated transcranial magnetic theta-burst stimulation in the rat. *Brain Stimul* 6, 598-606.
- Vucic, S., Ziemann, U., Eisen, A., Hallett, M., Kiernan, M.C., 2013. Transcranial magnetic stimulation and amyotrophic lateral sclerosis: pathophysiological insights. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84, 1161-1170.
- Vujotic, L., Matic, S., Borkovic-Mitic, S., Stojisavljevic, A., Mutic, J., Bascarevic, V., Jokovic, M., Pavlovic, S., 2020. Association between oxidative stress biomarkers and concentrations of some metal ions in the blood of patients with brain tumors and hydrocephalus. *Arch Med Sci* 16, 811-819.
- Wang, W., Ballatori, N., 1998. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev* 50, 335-356.
- Wankerl, K., Weise, D., Gentner, R., Rumpf, J.J., Classen, J., 2010. L-type voltage-gated Ca²⁺ channels: a single molecular switch for long-term potentiation/long-term depression-like plasticity and activity-dependent metaplasticity in humans. *J Neurosci* 30, 6197-6204.
- Wassermann, E.M., 1998. Risk i safety of repetitive transcranial magnetic stimulation: report and suggested guidelines from the International Workshop on the Safety of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation, June 5-7, 1996. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 108, 1-16.
- Wassermann, E.M., McShane, L.M., Hallett, M., Cohen, L.G., 1992. Noninvasive mapping of muscle representations in human motor cortex. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 85, 1-8.
- Watt, A.J., van Rossum, M.C., MacLeod, K.M., Nelson, S.B., Turrigiano, G.G., 2000. Activity coregulates quantal AMPA and NMDA currents at neocortical synapses. *Neuron* 26, 659-670.
- Wilson, N.R., Kang, J., Hueske, E.V., Leung, T., Varoqui, H., Murnick, J.G., Erickson, J.D., Liu, G., 2005. Presynaptic regulation of quantal size by the vesicular glutamate transporter VGLUT1. *J Neurosci* 25, 6221-6234.
- Wittenberg, G.F., Bastings, E.P., Fowlkes, A.M., Morgan, T.M., Good, D.C., Pons, T.P., 2007. Dynamic course of intracortical TMS paired-pulse responses during recovery of motor function after stroke. *Neurorehabil Neural Repair* 21, 568-573.
- Wojcik, S.M., Rhee, J.S., Herzog, E., Sigler, A., Jahn, R., Takamori, S., Brose, N., Rosenmund, C., 2004. An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in

postnatal development and control of quantal size. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7158-7163.

Woo, J., Min, J.O., Kang, D.S., Kim, Y.S., Jung, G.H., Park, H.J., Kim, S., An, H., Kwon, J., Kim, J., Shim, I., Kim, H.G., Lee, C.J., Yoon, B.E., 2018. Control of motor coordination by astrocytic tonic GABA release through modulation of excitation/inhibition balance in cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 5004-5009.

Xiao, N., 2016. Neurotrophic factors: promising candidates in tissue regeneration. *Neural Regen Res* 11, 735-736.

Xiao, N., Le, Q.T., 2016. Neurotrophic Factors and Their Potential Applications in Tissue Regeneration. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 64, 89-99.

Xu, W., Cormier, R., Fu, T., Covey, D.F., Isenberg, K.E., Zorumski, C.F., Mennerick, S., 2000. Slow death of postnatal hippocampal neurons by GABA(A) receptor overactivation. *J Neurosci* 20, 3147-3156.

Yamanaka, K., Yamagata, B., Tomioka, H., Kawasaki, S., Mimura, M., 2010. Transcranial magnetic stimulation of the parietal cortex facilitates spatial working memory: near-infrared spectroscopy study. *Cereb Cortex* 20, 1037-1045.

Yao, J.A., Jiang, M., Tseng, G.N., 1997. Mechanism of enhancement of slow delayed rectifier current by extracellular sulfhydryl modification. *Am J Physiol* 273, H208-219.

Yasuda, H., Barth, A.L., Stellwagen, D., Malenka, R.C., 2003. A developmental switch in the signaling cascades for LTP induction. *Nat Neurosci* 6, 15-16.

Youssef, F.F., Addae, J.I., McRae, A., Stone, T.W., 2001. Long-term potentiation protects rat hippocampal slices from the effects of acute hypoxia. *Brain Res* 907, 144-150.

Yue, L., Xiao-lin, H., Tao, S., 2009. The effects of chronic repetitive transcranial magnetic stimulation on glutamate and gamma-aminobutyric acid in rat brain. *Brain Res* 1260, 94-99.

Zander, J.F., Munster-Wandowski, A., Brunk, I., Pahner, I., Gomez-Lira, G., Heinemann, U., Gutierrez, R., Laube, G., Ahnert-Hilger, G., 2010. Synaptic and vesicular coexistence of VGLUT and VGAT in selected excitatory and inhibitory synapses. *J Neurosci* 30, 7634-7645.

Zanette, G., Forgiione, A., Manganotti, P., Fiaschi, A., Tamburin, S., 2008. The effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on motor performance, fatigue and quality of life in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 270, 18-22.

Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J., 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 33, 337-349.

Zhang, L., Bose, P., Warren, R.A., 2014. Dopamine preferentially inhibits NMDA receptor-mediated EPSCs by acting on presynaptic D1 receptors in nucleus accumbens during postnatal development. *PLoS One* 9, e86970.

Zhang, Y., Tan, F., Xu, P., Qu, S., 2016. Recent Advance in the Relationship between Excitatory Amino Acid Transporters and Parkinson's Disease. *Neural Plast* 2016, 8941327.

Zink, M., Vollmayr, B., Gebicke-Haerter, P.J., Henn, F.A., 2010. Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression. *Neuropharmacology* 58, 465-473.