

Traumatska ozljeda mozga u štakora: mehanizmi oštećenja i oporavka te učinci pioglitazona i enoksaparina

Pilipović, Kristina

Doctoral thesis / Disertacija

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:979784>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Kristina Pilipović

TRAUMATSKA OZLJEDA MOZGA U ŠTAKORA: MEHANIZMI OŠTEĆENJA I
OPORAVKA TE UČINCI PIOGLITAZONA I ENOKSAPARINA

Doktorski rad

Rijeka, 2011.

Mentori rada: prof. dr. sc. Gordana Župan, doc. dr. sc. Željko Župan

Doktorski rad obranjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

Rad ima 151 list.

UDK: 616-001.31:612.82:616-085:616-092.4/.9(043)

Sažetak

Cilj istraživanja

Cilj doktorskog rada bio je proučiti: a) stupanj oksidativnog oštećenja lipida i proteina, potom aktivnosti antioksidativnih enzima (superoksid dismutaze, SOD i glutation peroksidaze, GSH-Px), ekspresije različitih proteina (proupalnih čimbenika COX-2 i iNOS, inhibitora NFκB upalnog signalnog puta, IκBα, kao i endogenih neuroprotektivnih proteina, BDNF i HSP70) i sadržaj vode u različitim strukturama mozga, te b) učinke pioglitazona (PPARγ agonista) i enoksaparina (heparina niske molekularne mase) na istraživane pokazatelje oksidativnog stresa i ekspresije gore navedenih proteina u štakora s traumatskom ozljedom mozga (engl. *traumatic brain injury*, TBI).

Materijal i metode

Trauma mozga umjerene jakosti učinjena je metodom lateralne ozljede tlakom (engl. *lateral fluid percussion injury*) u području lijevog parijetalnog korteksa. Razine produkata lipidne peroksidacije, te aktivnosti SOD i GSH-Px u homogenatima tkiva, određivane su spektrofotometrijom. Stupanj oksidacijskog oštećenja proteina (sadržaj proteinskih karbonilnih skupina), te razine ekspresija različitih proteina u tkivnim lizatima mjerene su Western blot metodom. U dijelu istraživanja korištene su histološke i imunohistokemijske metode. Za detekciju obrasca oštećenja tkiva korištena su bojanja hemalaun-eozin i krezil violet. Regionalne distribucije ekspresija COX-2 i HSP70 analizirane su imunohistokemijski. S ciljem istraživanja oksidacijskog oštećenja, upalnog odgovora, te razina ekspresija proteina u različitim regijama mozga, životinje su žrtvovane 24 sata nakon indukcije TBI. Životinje kontrolne skupine bile su podvrgnute lažnoj TBI. Dio životinja žrtvovan je 48 sati nakon TBI s ciljem određivanja postojanja posttraumatskog edema mozga. U dijelu pokusa, u kojima su istraživani učinci pioglitazona u TBI, traumatizirane životinje bile su jednokratno tretirane navedenim glitazonom (1 ili 3 mg/kg) ili otapalom (dimetil-sulfoksid), 10 minuta nakon

indukcije TBI. Štakori kontrolne skupine bili su podvrgnuti istovjetnim postupcima, uključujući aplikaciju otapala, osim što im nije bila izazvana TBI. Životinje ovog dijela istraživanja bile su žrtvovane 24 sata nakon traume mozga. U dijelu pokusa u kojima su istraživani učinci enoksaparina u TBI, pokusne su životinje bile tretirane istraživanim lijekom (1 mg/kg) ili otapalom (voda za injekcije) 1 sat nakon indukcije TBI, te s dodatnih 7 doza primijenjenih svakih 6 sati nakon prve doze, a bile su žrtvovane 48 sati nakon izazivanja TBI. Životinje kontrolne skupine bile su lažno ozlijeđene, a umjesto enoksaparina injicirano im je odgovarajuće otapalo.

Rezultati

TBI umjerene jakosti uzrokovala je najjače oštećenje mozga u području parijetalnog korteksa i hipokampusa štakora. U navedenim moždanim strukturama nakon TBI evidentirani su porasti razina produkata lipidne peroksidacije i sadržaja proteinskih karbonilnih skupina, te povišene razine ekspresija COX-2 nakon ozljede mozga. U obje navedene strukture zabilježena je povećana aktivnost GSH-Px. Ekspresija COX-2 bila je povećana i u talamusu, te entorinalnom korteksu ozlijeđenih životinja. U hipokampusu, dodatno, bile su povećane razine ekspresija iNOS, IkB α , te proBDNF, a smanjena razina mBDNF. U parijetalnom korteksu zabilježene su i smanjene ekspresije IkB α , te HSP70. U entorinalnom korteksu ekspresija proBDNF bila je povećana. U talamusu su bili pojačani i izražaji iNOS i IkB α . Edem mozga uzrokovan TBI zabilježen je u ipsi- i kontralateralnom parijetalnom korteksu, ipsilateralnom hipokampusu, te cerebelumu. Djelovanje pioglitazona i enoksaparina testirano je u parijetalnom korteksu i hipokampusu ozlijeđenih štakora. Pronađeno je da su učinci pioglitazona u modelu TBI ovisni o dozi lijeka i moždanoj strukturi. Sukladno navedenom, pioglitazon može smanjiti oksidativno oštećenje lipida i proteina, povećati aktivnost GSH-Px, smanjiti ekspresiju iNOS, te povećati izražaje proBDNF i mBDNF. Enoksaparin, u testiranim

eksperimentalnim uvjetima, djelovao je neuroprotektivno u obje moždane strukture. U parijetalnom korteksu ozlijeđenih životinja povećao je aktivnost GSH-Px i ekspresiju I κ B α , a smanjio izražaj COX-2. U hipokampusu štakora s TBI smanjio je oksidativno oštećenje lipida i proteina, te ekspresiju proupalnog COX-2 proteina.

Zaključak

TBI uzrokuje jako oksidacijsko i upalno oštećenje parijetalnog korteksa i hipokampusa štakora. U ostalim moždanim strukturama, nakon traume mozga, bilježe se promjene pojedinih proupalnih, te endogenih neuroprotektivnih proteina. Pioglitazon i enoksaparin mogu djelovati neuroprotektivno u modelu TBI.

Ključne riječi: Enoksaparin; Neuroprotekcija; Oksidativni stres; Pioglitazon; Štakor; Traumatska ozljeda mozga; Upala

Summary

Objectives

The purpose of this PhD thesis was to study: a) the degree of lipid and protein oxidative damage, antioxidant enzymes' (superoxide dismutase, SOD and glutathione peroxidase, GSH-Px) activities, the expressions of different proteins (proinflammatory factors COX-2 and iNOS, an NF κ B signaling pathway inhibitor I κ B α , and the endogenous neuroprotective proteins, BDNF and HSP70), and water content in different brain structures, as well as b) the effects of pioglitazone (PPAR γ agonist) and enoxaparin (low molecular weight heparin) on the tested parameters of oxidative stress and the expressions of the aforementioned proteins in rats with traumatic brain injury (TBI).

Material and Methods

Brain trauma of moderate severity was induced using the lateral fluid percussion injury model in the area of left parietal cortex. Levels of lipid peroxidation products, as well as the activities of SOD and GSH-Px in tissue homogenates were determined by spectrophotometry. The degree of protein oxidative damage (protein carbonyl content), and the levels of different proteins' expressions were determined using the Western blot method. In one part of the research, histological and immunohistological methods were used. Hematoxylin-eosin and cresyl violet stainings were used for the detection of the tissue damage extent. Regional distributions of COX-2 and HSP70 expressions were analyzed by immunohistochemistry. With the intent to investigate oxidative damage, inflammation, the expressions of different proteins, in various brain regions following traumatic injury, animals were sacrificed 24 h after the TBI induction. Animals of the control group were subjected to the sham TBI. A part of the animals were sacrificed 48 h after TBI in order to determine the existence of posttraumatic brain edema. In the part of the research, in which the effects of pioglitazone were investigated, injured animals were treated with single dose of the tested

glitazone (1 or 3 mg/kg) or by vehicle (dimethyl sulfoxide), 10 min after the TBI induction. Rats of the control group were handled identically, except that they were not subjected to TBI. Animals used in this part of the research were sacrificed 24 h following TBI onset. In the part of the research which was focused on the effects of enoxaparin in TBI, experimental animals were treated with the tested drug (1 mg/kg) or with vehicle (water for injections) 1 h after the TBI induction, and additionally with 7 more doses applied every 6 h after the first dose. All rats of this part of the study were sacrificed 48 h after the TBI induction. Animals of the control group were sham injured, and, instead of enoxaparin, they were injected with appropriate vehicle.

Results

TBI of moderate severity caused the most prominent brain damage in the rat area of parietal cortex and hippocampus. In the mentioned brain structures, increased levels of the lipid peroxidation products, protein carbonyls and the COX-2 expressions after TBI were detected. Increased GSH-Px activities in both mentioned structures were recorded. COX-2 protein expressions were also augmented in the thalamus and in the entorhinal cortex of the injured rats. Additionally, following the brain injury, in the hippocampus, the iNOS, I κ B α , and proBDNF expressions were increased, while the mBDNF expression was decreased. In the parietal cortex decreased expressions of the I κ B α and HSP70 were detected. In the entorhinal cortex, the proBDNF expression was increased. Furthermore, in the thalamus, increased expressions of iNOS and I κ B α were detected. Brain edema caused by TBI was recorded in the ipsi- and contralateral parietal cortex, ipsilateral hippocampus, and cerebellum. Effects of pioglitazone and enoxaparin were tested in the parietal cortex and the hippocampus of the injured rats. It was established that the effects of pioglitazone, in the TBI model used, were dose-, and the brain structure-related. Pioglitazone can reduce oxidative

lipid and protein damage, increase the GSH-Px activity, reduce the iNOS, and increase the proBDNF and mBDNF expressions. Enoxaparin, in the experimental conditions used, was neuroprotective in both brain structures tested. In the parietal cortex of injured animals, enoxaparin increased the GSH-Px activity and the I κ B α expression, and decreased the COX-2 expression. In the hippocampus of rats with TBI, it reduced oxidative lipid and protein damage, and also attenuated injury-induced increase in the COX-2 protein expression.

Conclusion

TBI causes prominent oxidative and inflammatory damage of the parietal cortex and hippocampus in rats. Changes of some proinflammatory and endogenous neuroprotective proteins were recorded in the other brain structures tested following brain trauma. Pioglitazone and enoxaparin could be neuroprotective in experimental TBI.

Keywords: Enoxaparin; Inflammation; Neuroprotection; Oxidative stress; Pioglitazone; Rat; Traumatic brain injury

SADRŽAJ

1. Uvod i pregled područja istraživanja

1.1. Općenito o traumatskoj ozljedi mozga	2
1.2. Patogeneza traumatske ozljede mozga	4
1.2.1. Primarna ozljeda mozga	4
1.2.2. Sekundarna ozljeda mozga	5
1.2.2.1. Oksidativni stres	6
1.2.2.2. Upala	11
1.2.2.3. Transkripcijski čimbenici	14
1.2.3. Protektivni čimbenici u traumatskoj ozljedi mozga	18
1.2.3.1. Proteini toplinskog šoka	18
1.2.3.2. Neurotrofini	19
1.3. Eksperimentalni modeli traumatske ozljede mozga	21
1.3.1. Modeli žarišne traumatske ozljede mozga	21
1.3.2. Modeli difuzne traumatske ozljede mozga	22
1.3.3. Kombinirani model žarišne i difuzne traumatske ozljede mozga	23
1.4. Farmakoterapija traumatske ozljede mozga	23
1.4.1. Sadašnje stanje	23
1.4.2. Pioglitazon	24
1.4.3. Enoksaparin	27

2. Ciljevi istraživanja28

3. Materijal i metode

3.1. Materijal	31
3.1.1. Pokusne životinje i etički aspekti istraživanja	31
3.1.2. Lijekovi	31
3.1.3. Kemikalije	31
3.1.4. Primarna protutijela	32
3.1.5. Sekundarna protutijela	32
3.2. Metode	33
3.2.1. Traumatska ozljeda mozga u štakora	33
3.2.2. Tretman lijekovima	35
3.2.3. Biokemijske analize	36
3.2.3.1. Priprema uzoraka mozga za biokemijske analize	36
3.2.3.2. Priprema uzoraka mozga za Western blot analize	37
3.2.3.3. Određivanje razine produkata lipidne peroksidacije	37
3.2.3.4. Određivanje stupnja oksidativnog oštećenja proteina	38
3.2.3.5. Određivanje razina aktivnosti antioksidativnih enzima	38
3.2.3.6. Western blot analize razine ekspresija proteina	40
3.2.3.7. Određivanje koncentracije proteina	41
3.2.4. Histokemijske i imunohistokemijske metode	41
3.2.4.1. Priprema mozгова za histološke analize	41
3.2.4.2. Histokemijske analize	41
3.2.4.3. Imunohistokemijske metode	41
3.2.5. Mjerenje edema mozga	42

3.3. Statistička obrada podataka	43
--	----

4. Rezultati

4.1. Moždano oštećenje i endogena neuroprotekcija u traumatskoj ozljedi mozga u štakora	45
4.1.1. Histološke moždane promjene nakon traumatske ozljede mozga u štakora	45
4.1.2. Oksidativno oštećenje lipida i proteina u različitim moždanim strukturama štakora nakon traumatske ozljede mozga	49
4.1.3. Aktivnosti antioksidativnih enzima u različitim moždanim strukturama štakora nakon traumatske ozljede mozga	51
4.1.4. Razine ekspresija proteina od interesa u različitim moždanim strukturama štakora nakon traumatske ozljede mozga	52
4.1.5. Edem mozga u različitim moždanim strukturama štakora nakon traumatske ozljede mozga	61
4.2. Utjecaj pioglitazona na pokazatelje moždanog oštećenja i endogene neuroprotekcije u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga	63
4.2.1. Utjecaj pioglitazona na oksidativnog oštećenja lipida i proteina u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga	63
4.2.2. Utjecaj pioglitazona na aktivnosti antioksidativnih enzima u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga	66
4.2.3. Utjecaj pioglitazona na razine ekspresija proteina od interesa u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga	68
4.3. Utjecaj enoksaparina na pokazatelje moždanog oštećenja i endogene neuroprotekcije u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga	76
4.3.1. Utjecaj enoksaparina na oksidativno oštećenje lipida i proteina u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga	76
4.3.2. Utjecaj enoksaparina na aktivnosti antioksidativnih enzima u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga.....	79
4.3.3. Utjecaj enoksaparina na razine ekspresija proteina od interesa u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga	81

5. Rasprava

5.1. Utjecaj traumatske ozljede mozga na pokazatelje moždanog oštećenja i endogene neuroprotekcije u različitim moždanim strukturama štakora	91
5.1.1. Utjecaj traumatske ozljede mozga na oksidativno oštećenja lipida i proteina u različitim moždanim strukturama štakora	91
5.1.2. Utjecaj traumatske ozljede mozga na aktivnosti antioksidativnih enzima u različitim moždanim strukturama štakora	93
5.1.3. Utjecaj traumatske ozljede mozga na razine ekspresija proteina od interesa u različitim moždanim strukturama štakora	94

5.1.4. Utjecaj traumatske ozljede mozga na razvoj edema u različitim moždanim strukturama štakora.....	102
5.2. Učinci pioglitazona na pokazatelje moždanog oštećenja i endogene neuroprotekcije u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga	102
5.2.1. Učinci pioglitazona na oksidativno oštećenje lipida i proteina te aktivnosti antioksidativnih enzima u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga	102
5.2.2. Učinci pioglitazona na razine ekspresija proteina od interesa u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga	104
5.3. Učinci enoksaparina na pokazatelje moždanog oštećenja i endogene neuroprotekcije u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga	107
5.3.1. Učinci enoksaparina na oksidativno oštećenje lipida i proteina te aktivnosti antioksidativnih enzima u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga	107
5.3.2. Učinci pioglitazona na razine ekspresija proteina od interesa u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga	109
6. Zaključci	111
7. Literatura	113
Životopis	

1. Uvod i pregled područja istraživanja

1.1. Općenito o traumatskoj ozljedi mozga

Traumatska ozljeda mozga (engl. *traumatic brain injury*, TBI) stečeno je oštećenje navedenog organa središnjeg živčanog sustava (SŽS) uzrokovano djelovanjem vanjske, mehaničke sile. Radi se o dugotrajnom, moguće doživotnom, procesu koji utječe ne samo na mozak, već i na mnoge druge organe i organske sustave.

TBI je najčešći uzrok smrti i invaliditeta u osoba mladih od 40 godina, te stoga predstavlja značajan javnozdravstveni problem, kako u visoko industrijaliziranim državama, tako i u zemljama u razvoju (1).

U svijetu godišnje oko 10 milijuna ljudi zadobije TBI. U zemljama Europske unije godišnje se zbog TBI hospitalizira oko milijun ljudi (2), s ukupnom incidencijom od 235 slučajeva na 100000 stanovnika. U Europi je TBI odgovorna za najveći broj godina invaliditeta, te je među prva tri vodeća razloga medicinskih troškova (3, 4). Procjenjuje se da u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) svakih 21 sekundu jedna osoba, a godišnje 1,7 milijuna ljudi zadobije TBI (5). Od toga, oko 52000 je smrtnih ishoda, 275000 hospitalizacija, a 1,365 milijuna ljudi nakon akutnog medicinskog zbrinjavanja bude otpušteno iz bolnice. Od preživjelih, 80000 do 90000 bolesnika zadobije neki oblik invaliditeta kao trajnu posljedicu TBI (5).

Navedeni podatci o epidemiologiji TBI znatno su niži od stvarnih. Tako su npr. ozljede glave vezane uz sport i rekreaciju često blage prirode, nisu praćene gubitkom svijesti, te stoga prođu bez hospitalizacije. Procjenjuje se da u SAD-u takvih ozljeda bude godišnje čak 1,6 do 3,8 milijuna, od kojih samo oko 300000 ozljeđenika zatraži liječničku pomoć (6).

Muškarci su žrtve traume mozga 1,5 do 2 puta češće od žena (1). Najugroženije dobne skupine su djeca dobi 0 do 4 godine (incidencija 1355,3/100000 za mušku, 874,8/100000 za

žensku djecu), potom stariji adolescenti dobi 15 do 19 godina, te osobe starije od 75 godina (1).

Najčešći uzrok TBI su ozljede glave u prometnim nesrećama, koje čine 20 % uzroka svih TBI, potom padovi, rjeđe nasilje, a ostali uzroci su nezgode vezane uz sport i rekreaciju (1, 6).

TBI povećava dugoročni mortalitet, odnosno smanjuje očekivano trajanje života ozljeđenika. Prema studiji Harrison-Felix i sur. (7), u kojoj su proučavani uzroci smrti godinu dana nakon TBI, ozljeđenici umiru čak 37 puta češće od napadaja epilepsije, 12 puta češće od sepsikemije, 4 puta češće od upale pluća, te 3 puta češće od drugih respiratornih komplikacija u odnosu na opću populaciju. Iako su navedeni podatci donekle očekivani kad se radi o umjerenoj i teškoj TBI, čak i osobe koje su pretrpjele blagu TBI imaju statistički značajno smanjeno dugotrajno preživljenje (8).

U osoba koje su preživjele TBI značajno je povećana incidencija različitih oblika epilepsije, poremećaja spavanja, neurodegenerativnih bolesti (kronične traumatske encefalopatije, Parkinsonove i Alzheimerove bolesti), neuroendokrinih poremećaja i psihijatrijskih oboljenja, ali također i mišićno-skeletnih, metaboličkih i seksualnih poremećaja (9-13). Tako npr. u razdoblju od 1 do 3 godine nakon TBI, osobe koje su pretrpjele ozljedu mozga 1,8 puta češće pribjegavaju zlouporabi alkohola. U razdoblju dužem od 3 godine nakon TBI, ozljeđenici imaju 1,5 puta veći rizik za razvoj depresije, te 2,3 (za umjerenu TBI), odnosno 4,5 (za tešku TBI) puta veći rizik za razvoj Alzheimerove bolesti (6). Epilepsija u ovih ozljeđenika je 11 puta češća u odnosu na opću populaciju (6). Dodatno, čak i blaga TBI može uzrokovati dugotrajne kognitivne poteškoće, koje mogu utjecati na svakodnevne aktivnosti i poslovne sposobnosti pojedinaca (9).

Najznačajnija dugotrajna posljedica TBI je invaliditet. Prema istraživanju Selassie i sur. (13), u SAD-u je, od 288009 hospitaliziranih radi TBI tijekom 2003. godine, oko 124626

osoba razvilo dugotrajni invaliditet. Još uvijek je nejasno da li je on posljedica inicijalnog inzulta ili progresivne sekundarne ozljede. U slikovnim pretragama preživjelih pacijenata s umjerenom TBI pokazane su značajna progresija encefalomalacije, te subakutna ozljeda bijele tvari 4,5, odnosno 29 mjeseci nakon ozljede. Progresivna atrofija SŽS-a nakon TBI potvrđena je kako u pretkliničkim, tako i u kliničkim istraživanjima. Indirektan učinak TBI zamijećen je i u drugim organima, poput jetre i pluća (14). Uzrok histopatoloških promjena tih organa još uvijek je nepoznat, iako se pretpostavlja da bi one mogle biti posljedica migracije imunološki nekompetentnih stanica u periferne organe.

1.2. Patogeneza traumatske ozljede mozga

1.2.1. Primarna ozljeda mozga

Primarno traumatsko oštećenje mozga, koje nastaje neposredno po traumi, posljedica je direktnog djelovanja sile koja uzrokuje fizikalne poremećaje tkiva mozga i moždane vaskulature, te je glavna determinanta funkcionalnog ishoda ozljede (15). Djelovanjem sile na fiksiranu glavu nastaju impresijske ozljede, a ukoliko udarne sile prenose kinetičku energiju ubrzanjem (akceleracijom) ili smanjenjem brzine (deceleracijom), neovisno o gibljivosti glave, mogu nastati akceleracijska ili deceleracijska gibanja mozga prema kostima lubanje. Potonjim mehanizmom nastaju ozljede mozga na mjestu udarca (engl. *coup injury*) i/ili na strani suprotnoj mjestu udarca (engl. *contra coup injury*). Djelovanjem sile na slobodno gibljivu glavu nastaju tzv. translacijska (ako sila djeluje u središnjoj ravnini) ili rotacijska (ako sila djeluje pod kutem ili tangencijalno) oštećenja mozga (16).

Ozljede mozga uzrokovane mehaničkom silom mogu se podijeliti na žarišne i difuzne (17). Žarišne ozljede su ograničene na lokalizirano područje mozga, dok difuzne ozljede mozga obuhvaćaju veća, generalizirana područja. Žarišne ozljede mozga mogu biti

nagnječenja, zgnječenja ili krvarenja u i/ili oko mozga (epiduralni i subduralni hematomi, subarahnoidalna, intracerebralna i intraventrikularna krvarenja). Dva su glavna tipa difuzne ozljede mozga: potres mozga i difuzna aksonalna ozljeda. Potres mozga je prolazna, privremena neurološka disfunkcija koja je rezultat primjene sile na mozak. Difuzne ozljede mozga rezultat su trešnje, deranja i inercijskih učinaka traumatskog udarca (18, 19). Teže ih je dijagnosticirati korištenjem standardnih radioloških metoda jer su karakterizirane mikrokrvarenjima i mikroskopskim promjenama na staničnoj razini (20). Značajke difuznih aksonalnih ozljeda su tzv. kidajuće sile koje djeluju na granici neokortikalne sive i bijele tvari, te sudjeluju u razvoju posttraumatskog edema mozga (15). Nadalje, difuzna aksonalna ozljeda može propagirati i sudjelovati u oštećenju sive tvari u područjima mozga udaljenim od mjesta inicijalne ozljede (21, 22). Najčešće su traumom uzrokovane ozljede mozga kombinacije žarišnog i difuznog oštećenja (16).

Primarna je ozljeda ireverzibilna i na nju se ne može djelovati terapijskom intervencijom.

1.2.2. Sekundarna ozljeda mozga

Već unutar nekoliko minuta, te dana nakon TBI odvijaju se različiti patofiziološki procesi koji doprinose sekundarnoj posttraumatskoj neuropatologiji. Neki od tih procesa mogu se odvijati i tijekom nekoliko mjeseci, pa i godina nakon primarnog inzulta (23).

Neposredno po TBI, kao rezultat direktnog oštećenja, te poremećaja regulacije moždanog krvotoka i metabolizma, u tkivu mozga nakupljaju se laktati (24) i povećava propusnost membrana. Navedeni procesi za posljedicu imaju nastanak edema mozga (25). Anaerobni metabolizam troši zalihe ATP-a, te se prekida rad o energiji-ovisnih membranskih ionskih pumpi (26). U drugom stadiju posttraumatske sekundarne ozljede mozga javljaju se membranske depolarizacije, pretjerano otpuštanje ekscitatornih neurotransmitera (glutamat,

aspartat), aktivacija ionotropnih glutamatnih receptora, te voltažno-ovisnih kalcijских i natrijskih kanala. Povećanim utokom iona kalcija i natrija započinju unutarstanični katabolički procesi. Ioni kalcija aktiviraju lipidne peroksidaze, proteaze, te fosfolipaze koje zatim povećavaju koncentracije slobodnih masnih kiselina (engl. *free fatty acids*, FFA) i slobodnih radikala (27). Dodatno se aktiviraju kaspaze, translokaze i endonukleaze, enzimi koji uzrokuju progresivne strukturalne promjene bioloških membrana, te fragmentaciju i inhibiciju popravka DNA. U krajnjem stadiju akutne ozljede razvija se membranska degradacija koja rezultira nekrotičnom smrću stanice ili se unutar stanica pokreću mehanizmi aktivacije programirane stanične smrti (28).

Jedan od najranijih procesa koji počinje nakon TBI je ekscitotoksično oštećenje stanica čije su glavne komponente povišenje unutarstanične koncentracije iona kalcija i aktivacija brojnih, o kalciju-ovisnih, unutarstaničnih procesa (29). Posljedično, stvaraju se reaktivni spojevi kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i dušika (engl. *reactive nitrogen species*, RNS) koji mogu uzrokovati oštećenje staničnih makromolekula, lipida, proteina i nukleinskih kiselina (27). Razvoj posttraumatske upale rezultat je primarne, nekrotične smrti stanica koja je karakterizirana razdrom staničnih membrana, te otpuštanjem unutarstaničnih komponenti u vanstanične odjeljke (30). U ozljeđeno tkivo otpuštaju se brojni, potencijalno štetni, unutarstanični enzimi, inače smješteni u lizosomima, a koji mogu pridonijeti oštećenju i smrti okolnih stanica (31).

1.2.2.1. Oksidativni stres

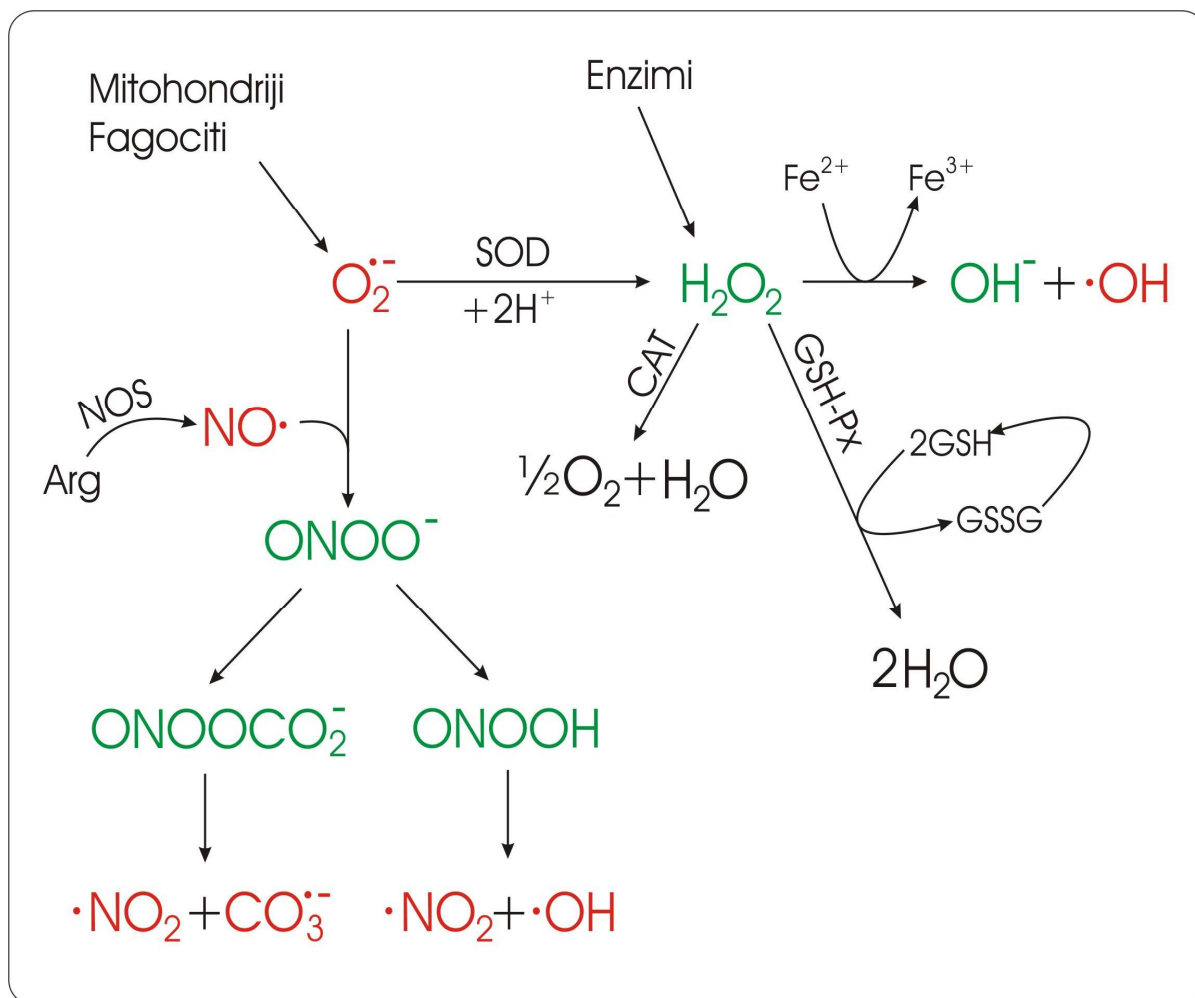
Davne 1954. godine Gerschman i sur. (32), a poslije njih McCord i Fridovich (33), otkrili su postojanje superoksidnog aniona i ukazali na njegovo značenje u toksičnosti kisika. Naime, kisik je, zbog svog velikog elektrokemijskog potencijala, oksidativna molekula u svim aerobnim organizmima, te omogućava proizvodnju velikih količina energije u procesu

staničnog disanja. Molekularni kisik se staničnim disanjem, djelovanjem enzima citokrom oksidaze, uglavnom izravno reducira u vodu. Manji dio molekularnog kisika (oko 3-5 %), zbog istjecanja elektrona iz mitohondrijskog lanca, prelazi u slobodne radikale koji doprinose njegovoj toksičnosti.

Redukcijom molekularnog kisika nastaju različiti ROS. Oni mogu biti radikali (superoksidni anion, hidroksilni radikal, hidroperoksidni radikal, karbonat, dušikov monoksid, dušikov dioksid, nitrat), ali i ne-radikali (vodikov peroksid, hipoklorna kiselina, peroksinitrit, peroksinitritna kiselina, organski peroksidi) (Slika 1.).

Superoksidni anion i vodikov peroksid u stanicama nastaju i drugim mehanizmima, npr. aktivnošću različitih enzima (ksantin oksidaze, citokroma p450, NADPH oksidaze), samooksidacijom malih molekula (npr. katekolamina). Hidroksilni radikal nastaje Haber-Weissovom reakcijom vodikovog peroksida i superoksidnog aniona, kataliziranom prijelaznim metalima u tzv. Fentonovoj reakciji. Visoko reaktivni hidroksilni radikal trenutačno se veže za stanične komponente što ga čini izrazito toksičnom molekulom (34).

ROS i RNS imaju važnu ulogu u sekundarnom oštećenju tkiva nakon traume mozga (35, 36). Naime, sve aerobne stanice mogu biti oksidativno oštećene, ali mozak se smatra posebno osjetljivim (34). Jedan od glavnih razloga velike osjetljivosti mozga prema toksičnosti kisika je visoka razine oksidativne metaboličke aktivnosti ovog organa. Čak 20 % ukupne potrošnje kisika odvija se u mozgu usprkos tome što on čini tek 2-4 % tjelesne mase. Tako velika potrošnja kisika u mozgu razlog je intenzivne proizvodnje ROS, kojoj dodatno pridonose i ekscitotoksične aminokiseline, autooksidabilni neurotransmitori, te različiti enzimi koji stvaraju vodikov peroksid (npr. monoamino oksidaze A i B). Mozak je osjetljiv na oksidativno oštećenje i zbog relativno niskog antioksidativnog kapaciteta (posebno su niske razine antioksidativnog enzima katalaze u većini moždanih regija), slabo izražene aktivnosti



Slika 1. Mehanizmi stvaranja reaktivnih spojeva kisika i dušika u ozljeđenim stanicama mozga. Crvenom bojom označeni su radikalni, a zelenom ne-radikalni reaktivni spojevi kisika, odnosno dušika. Skraćenice: $O_2^{\bullet-}$, superoksidni anion; H_2O_2 , vodikov peroksid; OH^- ; hidroksil; $\bullet OH$, hidroksilni radikal; $NO\bullet$; dušikov monoksid; $ONOO^-$, peroksinitrit; $ONOOCO_2^-$, nitrozoperoksikarbonat; $ONOOH$, peroksinitritna kiselina; $\bullet NO_2$, dušikov dioksid; $CO_3^{\bullet-}$, karbonat; SOD, superoksid dizmutaza; CAT, katalaza; GSH-Px, glutation peroksidaza; GSH, reducirani glutation; GSSG, oksidirani glutation; Arg, arginin; NOS, sintetaza dušikovog oksida.

mehanizama popravka, nemogućnosti dijeljenja neurona, te visokog omjera površine membrane neurona prema volumenu citoplazme (34). Tkivo mozga posebno je bogato prijelaznim metalima kao što su željezo, bakar i mangan, a za koje je dokazano da sudjeluju u stvaranju iznimno toksičnog hidroksilnog radikala.

Iako svi dijelovi stanice mogu reagirati sa slobodnim radikalima kisika, najvažnije radikalima posredovano oštećenje je oksidativno oštećenje lipida koje nastaje procesom

lipidne peroksidacije. Višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) esencijalne su za fiziološku funkciju staničnih membrana jer su mnoge osobitosti membrana, poput fluidnosti i propusnosti, usko vezane uz prisutnost nezasićenih i polinezasićenih postraničnih lanaca (37). PUFA su izrazito podložne procesu lipidne peroksidacije što rezultira gubitkom membranskih PUFA, odnosno povećanjem rigidnosti staničnih membrana. PUFA se oslobađaju iz membranskih fosfolipida brojnim enzimskim mehanizmima koji uključuju stimulaciju fosfolipaze A2 posredovanu receptorima za ekscitotoksične aminokiseline, kao i stimulaciju fosfolipaza C (engl. *phospholipase C*, PLC) / diacilglicerol (DAG) lipaznog puta. U fiziološkim uvjetima lipaze i fosfolipaze uključene su u održavanje funkcioniranja stanice stvaranjem i otpuštanjem arahidonske kiseline i eikosanoida. U patološkim uvjetima, npr. u akutnoj traumi, navedeni enzimi mogu biti uključeni u masivno otpuštanje FFA i eikosanoida koji mogu uzrokovati ozbiljna oštećenja stanice. U fiziološkim uvjetima, pretjerano stvaranje lipidnih peroksida regulirano je antioksidativnim obrambenim mehanizmima (38), no prenaplašen oksidativni stres može uzrokovati prekid normalnog staničnog funkcioniranja.

Oksidativno oštećenje proteina može biti uzrokovano direktno s ROS te, indirektno, produktima lipidne peroksidacije, kao što su malondialdehid (MDA) i 4-hidroksinonenal (4-HNE). Cilj djelovanja reaktivnih spojeva može biti peptidna veza ili neki od postraničnih lanaca unutar samog proteina (39). Te su reakcije često posredovane metalnim kationima, primjerice željezom ili bakrom. Pritom može doći do cijepanja ili međusobnog povezivanja proteina, te nastaju produkti manje, odnosno veće molekulske mase (40). Također, kao posljedica stvaranja RNS, na proteine se vežu i peroksinitriti, dušikov monoksid i dušikov dioksid koji mogu uzrokovati nitraciju proteina, odnosno stvaranje 3-nitrotirozina (41).

Nakon eksperimentalne TBI zabilježeno je oksidativno oštećenje proteina mozga (42, 43). Oksidacija proteina može biti povezana sa specifičnim oštećenjima pojedinih

aminokiselina, posljedica čega je oksidativno oštećenje brojnih enzima (44-47), te receptorskih i transportnih proteina. Reed i sur. (48) pokazali su da su nakon TBI nitracijom promijenjeni proteini uključeni u procese energetskog metabolizma (npr. ATP sintaza), te neurotransmisije (npr. sinapsin 1, gama enolaza, α -spektrin). TBI može uzrokovati i nitraciju pojedinih šaperona (molekulskih pratioca proteina koji sudjeluju u njihovom pravilnom namatanju).

Pojačano stvaranje ROS u blizini molekula DNA može uzrokovati njihovo oksidativno oštećenje. Oksidacija DNA uključuje oštećenja dušikovih baza i šećernih komponenti što može uzrokovati lomove lanaca, mutacije gena, te rezultirati programiranom smrću stanica (49, 50). Oksidacija DNA pokazana je i u različitim neurodegenerativnim oboljenjima (51, 52), a kisikovim radikalima posredovano oštećenje DNA dokazano i u eksperimentalnoj TBI (53-55). Mozak je u fiziološkim uvjetima zaštićen od štetnih učinaka slobodnih radikala raznim prirođenim enzimskim i ne-enzimskim obrambenim mehanizmima.

Superoksid dizmutaza (SOD) (EC 1.15.1.1.) pripada klasi enzima koji imaju važnu antioksidativnu zaštitnu ulogu u gotovo svim stanicama izloženim kisiku. McCord i Fridovich (33) otkrili su da ovaj metaloenzim katalizira dizmutaciju superoksidnog radikala u manje toksičan vodikov peroksid. Postoje tri izoforme SOD u sisavaca: citosolna Cu/Zn-SOD (također poznata kao SOD1), mitohondrijska Mn-SOD (također poznata kao SOD2) i izvanstanična SOD (EC-SOD) (33).

U eksperimentalnim studijama TBI aktivnost ovoga enzima uglavnom je ili snižena (56, 57) ili nepromijenjena (58-60). U studiji Yunoki i sur. (61) zabilježeno je tek prolazno povećanje aktivnosti SOD u ozljeđenom korteksu unutar prvih 6 sati nakon TBI.

SOD mora djelovati s enzimima koji uklanjaju vodikov peroksid. Osim u mozgu slabo prisutne katalaze, najvažniji enzimi koji uklanjaju perokside su glutathion peroksidaza (GSH-Px) i peroksiredoksini (62).

GSH-Px opći je naziv za obitelj enzima koji sadrže selen, a imaju peroksidaznu aktivnost. Glavna je uloga GSH-Px zaštita stanica od oksidativnog oštećenja smanjenjem količine slobodnog vodikovog peroksida pretvorbom u vodu, kao i redukcija lipidnih hidroperoksida do odgovarajućih alkohola (63). U organizmu čovjeka nalazi se osam različitih izoformi GSH-Px. One se razlikuju u primarnoj sekvenci, celularnoj i subcelularnoj lokalizaciji, kao i u specifičnosti prema različitim supstratima. GSH-Px 1 (tzv. citosolna ili stanična GSH-Px) je najrasprostranjenija izoforma GSH-Px. Izražena je u citoplazmi gotovo svih tkiva sisavaca, a supstrat joj je vodikov peroksid. GSH-Px 4 (poznata i kao fosfolipidna hidroperoksidna GSH-Px) membranski je enzim koji ima visok afinitet za hidroperokside lipida. Navedena se izoforma enzima nalazi u testisima, mozgu i srcu sisavaca. GSH-Px 2 je crijevni, izvanstanični enzim, a GSH-Px 3 se nalazi u vanstaničnom odjeljku. Posebno velike razine GSH-Px 3 detektirane su u plazmi čovjeka.

Nekoliko je objavljenih studija u kojima je istraživana aktivnost GSH-Px u eksperimentalnoj TBI. Rezultati navedenih studija znatno se razlikuju, te se bilježe povećanja (56, 57, 59), ali i smanjenja (42, 64, 65) aktivnosti navedenog enzima u mozgu nakon TBI. Slični su i rezultati u svezi posttraumatske ekspresije gena za GSH-Px. Bilježe se, naime, i porast i sniženje u izražaju ovog enzima (66, 67). Različiti su i rezultati studija na transgeničnim životinjama koje imaju pojačanu ekspresiju gena za GSH-Px, te su opisani i korisni učinci (68, 69), ali i neučinkovitost (70) pojačane ekspresije ovog enzima u ranom spašavanju neurona nakon TBI.

1.2.2.2. Upala

Upalni odgovor jedan je od najvažnijih sekundarnih procesa u patofiziologiji TBI (71). Upala je fiziološka reakcija tkiva na ozljedu. Mehaničko oštećenje tkiva, koje rezultira iz primarne ozljede, karakterizirano je puknućem membrana stanica i staničnih organela, kao i

krvnih žila. Rani upalni odgovor pokreće se kao reakcija na ekstravazaciju krvnih produkata, oslobađanje unutarstaničnih komponenti, ali i na stvaranje ROS i RNS od strane, u tkivu mozga prisutnih, upalnih stanica (mikroglije i astrocita) (72, 73).

Nakon početne upalne reakcije slijedi daljnje otpuštanje različitih proupalnih medijatora. Među važnijim endogenim medijatorima posttraumatske neuroupale su prostaglandini (PG) (74-76), proupalni citokini (30, 77-79), kemokini (30), te komponente komplementa (80, 81). Ovi medijatori mogu posredovati aktivaciju i migraciju leukocita iz krvi kroz krvno moždanu barijeru (KMB) u subarahnoidalni prostor (82). Navedene upalne stanice doprinose razvoju sekundarne ozljede, pojačavajući i podržavajući upalni odgovor u ozljeđenom mozgu (83-85). Iako je dugo vremena smatrano da je SŽS, radi svoje odvojenosti od periferne cirkulacije, na neki način zaštićen od sustavnog imunološkog odgovora, posljednjih godina otkriveno je da je upalni odgovor umnogome prisutan u području mozga (71). Pokazano je, također, da neuroni, astrociti i mikroglija mogu sintetizirati upalne medijatore, prisutne inače u tzv. perifernom imunološkom sustavu, te da mogu posjedovati i receptore za navedene medijatore (86-91). Zadnjih se godina raspravlja o tzv. dualnoj ulozi neuroupale nakon TBI. Naime, upalne stanice u mozgu mogu sintetizirati različite neurotrofične čimbenike, te potaknuti preživljenje neurona, a mogu imati i dodatne imunomodulatorne učinke (92-94).

Nakon TBI, arahidonska kiselina oslobađa se iz membrana ozljeđenih stanica djelovanjem fosfolipaza (37, 95, 96), te se pretvara u PG pod utjecajem unutarstaničnog enzima ciklooksigenaze (engl. *cyclooxygenase*, COX). Navedeni je enzim prisutan u organizmu u bar dvije izoforme, COX-1 i COX-2.

COX-1 izoforma konstitutivno je prisutna u stanicama. U izrazito niskim koncentracijama nalazi se i u mikrogliji diljem mozga (97-98), no ova izoforma se, za razliku od COX-2, slabije inducira pod utjecajem neuronalnih poremećaja.

COX-2, inducibilna izoforma enzima, regulira ključne metaboličke korake u biosintezi prostanoida (99) za koje se smatra da imaju važne uloge u SŽS, kao što su npr. regulacija tjelesne temperature ili dugotrajna potencijacija hipokampusa (100, 101). U fiziološkim uvjetima COX-2 slabo je izražen u većini organa u tijelu, no značajne razine mRNA za COX-2 bilježe se u mozgu sisavaca (102, 103). U zdravom mozgu COX-2 protein pronađen je prvenstveno u tijelima i dendritima neurona (104-108). Niske razine COX-2 prisutne su u neuronima moždane kore, hipokampusa i malog mozga, ali ne u glija ili endotelnim stanicama. U mozgu štakora metodom *in situ* hibridizacije pokazana je visoka razina COX-2 mRNA u piramidalnim i zrnatim stanicama hipokampusa, te zrnatim stanicama malog mozga. Umjerene razine COX-2 mRNA nađene su u piramidalnim stanicama piriformnog korteksa, celularnim slojevima moždane kore, centralnoj jezgri amigdala, te u nekoliko jezgara hipotalamusa.

Ekspresija i aktivnost COX-2 fiziološki su regulirane glutamatergičnom sinaptičkom aktivnošću (107, 109). Zanimljivo je da samo toksične doze različitih agonista glutamatnih receptora uzrokuju prejaku ekspresiju COX-2 mRNA u staničnim kulturama neurona (110, 111), te da je u ozljeđenom mozgu COX-2 pojačano izražen u neuronima i gliji, ali ne i u endotelnim i drugim oblažućim stanicama, što se razlikuje od reakcije perifernih tkiva na upalu (112, 113). Stoga se čini da upalne stanice, te stanice koje oblažu moždano tkivo reguliraju ekspresiju COX-2 mehanizmima koji su ovisni o aktivnosti interleukina (IL)-1 (114). To nije slučaj u neuronima i astrocitima, u kojima je indukcija COX-2 posredovana ekscitotoksičnim i oksidativnim mehanizmima (107).

Pojačana ekspresija COX-2 nakon TBI u početku je dio adaptivnog odgovora tkiva na ozljedu, dok je produljena, prejaka aktivacija ovog, dominantno proupalnog enzima, povezana sa štetnim posljedicama. Potonje je potvrđeno nalazom pojačane COX-2 ekspresije upravo u regijama mozga koje su specifično povezane s funkcionalnim deficitima nakon neurotraume

(104, 115). U recentnim studijama pokazano je da sistemsko davanje inhibitora COX-2 uzrokuje poboljšanje funkcionalnog oporavka pokusnih životinja nakon TBI (99, 115, 116).

PG, produkti aktivnosti COX-2, pronađeni su u umjerenim koncentracijama u ljudskom mozgu (117). U fiziološkim uvjetima, od PG u mozgu najviše su izražene razine PGD₂, no ozljede mozga potiču snažnu produkciju i ostalih prostanoida, od kojih se posebno ističe PGE₂ (74-76). Ovi eikosanoidi aktiviraju receptore spregnute s G-proteinima (118), a mogu djelovati izravno, poput kemokina i neuromodulatora.

1.2.2.3. Transkripcijski čimbenici

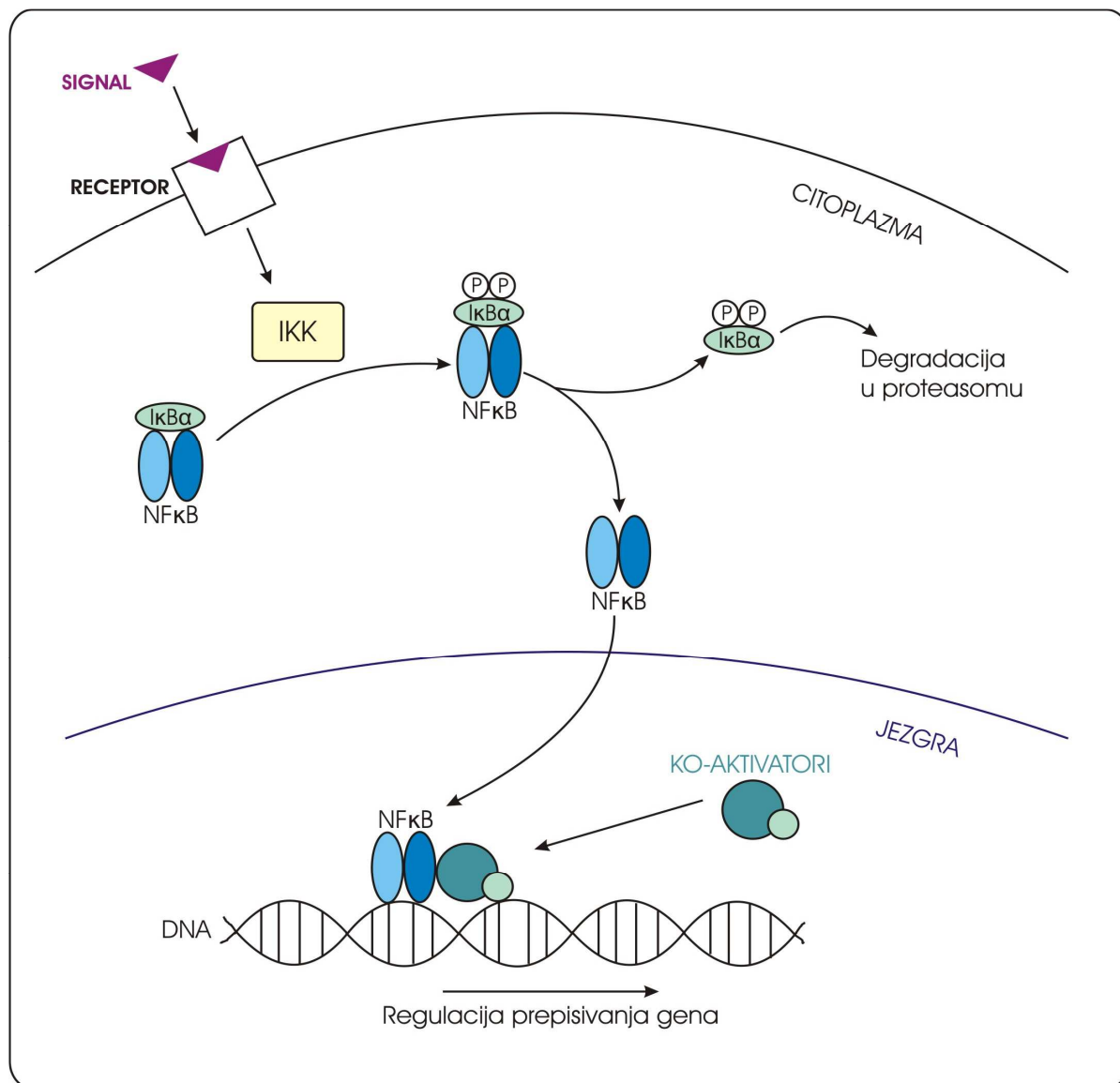
Neuroni smješteni u pogođenom području nakon ozljeda mozga, kemijske, mehaničke ili ishemijske prirode, mogu umrijeti ili preživjeti (28). Nekrotična smrt neurona neovisna je o prepisivanju gena. Suprotno, za pokretanje programirane stanične smrti, apoptoze, nužna je transkripcijska aktivacija gena. Jednako tako, inicijacija prepisivanja gena zaduženih za regeneraciju i popravak posreduje stvaranje novih međustaničnih veza i sinaptičko povezivanje preživjelih neurona u pokušaju adaptacije na novonastali okoliš, pa tako i nakon TBI (119).

Unutar nekoliko sati po ozljedi mozga, stanice mikroglije aktiviraju se i migriraju u oštećeno područje te odstranjuju ostatke mrtvih stanica (93). Nekoliko dana nakon ozljede mozga, aktiviraju se i astrociti koji postaju hipertrofični (93). Navedene promjene potpornih stanica, kao i opisane reakcije neurona nakon ozljede mozga, posredovane su djelovanjem transkripcijskih čimbenika koji moduliraju ekspresiju gena. Iako su nakon ozljeda mozga bilo koje etiologije, a tako i nakon TBI, aktivirani brojni transkripcijski čimbenici, nužno je dobro razumijevanje njihovog doprinosa k preživljenju neurona. No, razlučivanje svih funkcija pojedinih transkripcijskih čimbenika aktiviranih nakon ozljede mozga iznimno je teško zbog složenosti ovog odgovora, kao i činjenice da se on proteže kroz duže vremensko razdoblje.

Uloga NO u sekundarnom oštećenju mozga nakon traumatske ozljede bila je predmetom mnogih dosadašnjih istraživanja (120). NO, plinovita signalna molekula, sintetizira se iz aminokiseline L-arginina djelovanjem endotelne (eNOS), neuronalne (nNOS) ili inducibilne (iNOS) izoforme enzima NOS (120). Rezultati navedenih studija ukazuju da je aktivnost eNOS i nNOS maksimalna već nekoliko sekundi do minuta nakon TBI, ali jednako tako i da se vrlo brzo smanjuje na oko 50 % bazalne aktivnosti, te se na toj razini zadržava sve do 7 dana nakon ozljede (120-122). Suprotno navedenom, značajna indukcija ekspresije iNOS, kao i povećana koncentracija NO (120, 123), zabilježene su u humanoj i eksperimentalnoj TBI (124-135), u vremenskom razdoblju od nekoliko sati do više dana nakon TBI.

Nakon humane TBI, iNOS imunoreaktivne stanice detektirane su već 6 sati nakon traume (129), a povećana ekspresija ovog inducibilnog enzima perzistira i do 8 dana po TBI (127). U ovim studijama, iNOS pozitivni su, osim neurona, infiltrirajući makrofazi i neutrofil, potom mikroglia, astrociti, oligodendrociti te mišićne stanice krvnih žila.

Nuklearni čimbenik kapa B (NF- κ B) proteinski je kompleks koji kontrolira prepisivanje mnogih gena uključenih u stanični odgovor na podražaje kao što su stres, citokini, slobodni radikali, ultraljubičasto zračenje, te bakterijski ili virusni antigeni (136). Osim što NF κ B ima važnu ulogu u reguliranju imunološkog odgovora na infekciju, uključen je i u procese sinaptičke plastičnosti i memorije (137). Ovaj proteinski kompleks, kojeg čine homo- ili heterodimeri, sastavljen je od različitih podjedinica koje su članovi obitelji strukturno povezanih proteina, tzv. Rel/NF κ B proteina. Do sad je identicirano pet različitih Rel/NF κ B proteina koji se mogu podijeliti u dvije grupe. Prvu grupu čine RelA (p65), RelB i c-Rel, a zajedničko im je da svi posjeduju transaktivacijsku domenu koja im omogućava transkripcijsku aktivnost. Druga grupa Rel/NF κ B proteina, koju čine NF κ B1 (p50) i NF κ B2 (p52), ne posjeduje transaktivacijsku domenu i ne mogu sami djelovati na prepisivanje DNA.



Slika 2. Temeljni putevi aktivacije NFκB signalnog puta. NFκB se nalazi u citoplazmi stanice vezan za inhibicijski IκBα protein. Aktivacijski signali pokreću različite kaskadne reakcije koji uzrokuju fosforilaciju i degradaciju IκBα proteina, oslobađanje i translokaciju NFκB proteina u jezgru s posljedičnim djelovanjem na ekspresije mnogih gena. Skraćenice: IKK, IκB kinaza; IκBα, inhibitorni protein NFκB signalnog puta; NFκB, nuklearni čimbenik kapa B; P, fosfatna skupina; DNA, deoksiribonukleinska kiselina.

Najčešći oblik NFκB kompleksa sastoji se od RelA (p65) podjedinice i NFκB1 (p50) ili NF-κB2 (p52) podjedinice.

U odgovoru na štetne stanične podražaje NFκB se brzo aktivira. Naime, heterodimeri NFκB se u inaktivnom stanju nalaze u citoplazmi, u kompleksu s jednim od inhibicijskih

proteina obitelji I κ B. Do danas je poznato sedam članova I κ B obitelji proteina, I κ B α , I κ B β , I κ B γ , Bcl-3, I κ BNS, i I κ B ζ , od kojih je najpoznatiji i najbolje proučen I κ B α .

Razni ekstracelularni signali, posredstvom membranskih receptora, mogu aktivirati enzim I κ B kinazu (IKK) koja fosforilira I κ B proteine što rezultira njihovom ubikvitinacijom, disocijacijom od NF κ B i eventualnom degradacijom od strane proteasoma (Slika 2.). Tako oslobođeni, aktivirani NF κ B translocira se u jezgru gdje se veže za specifične sekvence DNA, te uz pomoć ko-aktivatora potiče prepisivanje brojnih gena uključujući one koji se prepisuju u citokine (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, interferon- γ), proteine koji potiču smrt ili preživljenje stanica (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-xs, Bax, XIAP, p53, Myc, Fax), adhezijske molekule (ICAM-1, VCAM, ELAM-1, E-selektin), COX-2, MnSOD, inducibilnu sintazu dušikovog oksida (iNOS), kao i mnoge druge proteine (137) (Slika 2.).

Proteini NF κ B obitelji pronađeni su u mnogim strukturama SŽS, no, za razliku od aktivacije ovog proteinskog kompleksa u drugim, ne-neuralnim stanicama izvan SŽS, koja je povezana s patološkim događajima, aktivacija NF κ B u središnjem živčevlju može biti potaknuta i ne-patološkim signalima, npr. neurotransmiterima.

Osim proupalnih učinaka NF κ B, povezanih s neurodegeneracijom nakon TBI, aktivacija ovog signalnog puta može imati i suprotne, protektivne učinke. Dualna uloga NF κ B još uvijek nije do kraja objašnjena. Jedno moguće tumačenje je da je aktivacija NF κ B u neuronima neuroprotektivna, a u glija stanicama neurotoksična (138). Različite posljedice aktivacije ovog transkripcijskog čimbenika objašnjavaju se još i razlikama u dimerima NF κ B, koji se aktiviraju nakon ozljede neurona. Naime, pronađeno je da aktivacija NF κ B p50/p65 dimera potiče prepisivanje proapoptotičkih gena iz obitelji Bcl-2, dok aktivacija c-Rel dimera specifično inducira Bcl-X(L) gene (139).

Aktivacija NF κ B ima važnu ulogu u patofiziološkim procesima mnogih neuroloških oboljenja, kao što su Parkinsonova, Alzheimerova i Huntigtonova bolest (140), žarišna i

globalna ishemija mozga (141, 142), te epilepsija (143). Aktivacija NF κ B u neuronima, ali i u ne-neuralnim stanicama u mozgu pronađena je, također, i nakon eksperimentalne TBI (126). Pojačana ekspresija NF κ B zabilježena je već jedan sat nakon ozljede, a u pojedinim stanicama traje i do godinu dana nakon TBI (144).

1.2.3. Protektivni čimbenici u traumatskoj ozljedi mozga

1.2.3.1. Proteini toplinskog šoka

Proteini toplinskog šoka (engl. *heat shock proteins*, HSPs) su klasa funkcionalno povezanih proteina koji su otkriveni 1962. godine (145). Moguće ih je podijeliti na konstitutivne (Hsc) i inducibilne (Hsp) podtipove koji se razlikuju prema aktivnosti u pojedinim uvjetima. Naime, u uvjetima u kojima nije prisutan stres u stanicama, Hsc djeluju kao molekulski pratioci, tj. sudjeluju u procesu recikliranja proteina. Suprotno tome, u uvjetima stresa aktiviraju se Hsp, te djeluju kao proteini odgovora na stres. Navedenoj klasi proteina pripada i HSP70 familija, strukturno i funkcionalno očuvana tijekom evolucije, te ubikvitarno prisutna u organizmima, od bakterija do ljudi. Proteini, članovi obitelji HSP70, su molekulski pratioci ovisni o ATP-u. Oni pomažu prilikom svijanja novostvorenih polipeptidnih lanaca, potom pri njihovom prolasku kroz stanične membrane, u stvaranju multiproteinskih kompleksa, te u vođenju proteina prema lizosoma s ciljem njihove razgradnje.

U slučaju utjecaja štetnih čimbenika na stanice, kao što su toplina, ishemija ili oksidativni stres, HSP70 može djelovati neuroprotektivno. Nekoliko se mehanizama smatra odgovornim za neuroprotekciju posredovanu s HSP70, kao što su inhibicija otpuštanja molekula pokretača apoptoze citokroma c i Smac/DIABLO iz mitohondrija, potom inhibicija proapoptotičkih čimbenika Apaf-1 i AIF, povećanje razine ključnog antiapoptotičkog proteina Bcl-2, očuvanje membranskog potencijala mitohondrija, modulacija upalnog odgovora,

smanjenje proizvodnje ROS i regulacija aktivnosti metaloproteinaza matriksa. HSP70, također, sprječava agregaciju denaturiranih proteina čime zaustavlja pokretanje procesa smrti stanice (146-148). Stabiliziranjem membrane lizosoma, HSP70 sprječava otpuštanje štetnih lizosomalnih hidrolaza u citosol (149). Nadalje, nađeno je i da HSP70 smanjuje aktivaciju NFκB, te posljedično i prepisivanje upalnih gena (150, 151).

Konstitutivna izoforma ove obitelji HSP, Hsc70, prisutna je u svim stanicama. Inducibilni Hsp70 slabo je prisutan u nestimuliranim stanicama, no njegov se izražaj povećava prilikom djelovanja štetnih podražaja. Proteini HSP70 obitelji prisutni su u SŽS-u u kontrolnim uvjetima, te su izraženi u neuronima i stanicama glije (152).

U humanoj TBI i u pojedinim eksperimentalnim modelima i zabilježene su promjene ekspresije HSP70 u moždanom tkivu nakon ozljede (153-175). Istraživanja ekspresije HSP70 u ljudi ukazuju na značajnu indukciju ovog gena u ozljeđenom korteksu (163, 170) unutar prva 24 sata nakon ozljede. Seidberg i sur. (170) analizirali su razine proteina obje izoforme HSP70, a njihovi rezultati ukazuju na značajno povećanu razinu Hsp70, ali ne i Hsc70 nakon TBI u ljudi. Rezultati istraživanja promjena ekspresija HSP70 u eksperimentalnoj TBI su različiti i ovise o korištenom modelu. Većina rezultata eksperimentalnih studija HSP70 ekspresije ukazuju na pojačano prepisivanje ovog gena u ozljeđenom mozgu unutar prva 24 sata po TBI (163, 170). Također je nađeno da indukcija gena za HSP70 ili pretretman s navedenim proteinom djeluju protektivno u modelima ozljede mozga (176, 177).

1.2.3.2. Neurotrofini

Neurotrofini su obitelj proteina koja ima važnu ulogu u mnogim funkcijama SŽS, poglavito u staničnoj diferencijaciji, preživljavanju neurona, migraciji, dendrogenezi, sinaptogenezi, te u sinaptičkoj plastičnosti (178). Obitelji neurotrofina pripadaju čimbenik

rasta živaca (engl. *nerve growth factor*, NGF), moždani neurotrofni čimbenik (engl. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), neurotrofin-3 (NT-3) i neurotrofin-4/5 (NT-4/5).

BDNF je protein koji djeluje na neurone središnjeg i perifernog živčanog sustava, pomaže preživljavanje postojećih, a potiče rast i diferencijaciju novih neurona i sinapsi (179). Posebno je značajno djelovanje BDNF u dijelovima mozga koji su uključeni u procese učenja i pamćenja, te razmišljanje i više intelektualne funkcije. Pokazano je također da BDNF potiče preživljavanje i diferencijaciju dopaminergičkih, kolinergičkih, te cerebelarnih neurona (180-182).

BDNF je obilno prisutan u SŽS-u, poglavito u hipokampalnim strukturama, moždanom korteksu i amigdaloidnom kompleksu (183). Tijekom embrionalnog razvoja, ekspresija BDNF se povećava. Najveća razina ekspresije navedenog proteina bilježi se nakon poroda, a potom se značajno ne smanjuje s dobi.

Svi neurotrofini, uključujući BDNF, sintetiziraju se kao pro-neurotrofini, tj. prekursori koji podliježu posttranslacijskim promjenama (179). Prekursor BDNF, proBDNF, prisutan je u mnogim regijama SŽS-a. Pro-neurotrofini se stvaraju u endoplazmatskom retikulumu, prelaze potom u Golgijev aparat i nakupljaju se u trans-Golgijevoj mreži u kojoj se mogu prevesti u zreli BDNF (engl. *mature BDNF*, mBDNF). Novostvoreni mBDNF potom se izlučuje iz neurona ili se anterogradno transportira u dendrite i završetke aksona od kuda se otpušta, ovisno o električnoj aktivnosti neurona (184-187). BDNF se može transportirati i retrogradno, od nastavaka do tijela stanica (188-190).

Smatra se da mBDNF nastaje dijelom i vanstaničnim cijepanjem proBDNF, djelovanjem proteaza matriksa, najvažnija od kojih je plazmin (191, 192). Kako je ovaj neurotrofin nađen i u neuronima koji nemaju sposobnost sinteze istog, smatra se da proBDNF mogu preuzeti pre-, ali i postsinaptički neuroni (193). Iako se dugo mislilo da je samo izlučeni, mBDNF biološki aktivan, a da je proBDNF isključivo prisutan u unutarstaničnom

odjeljku, recentnije studije pokazale su suprotno. Poznato je da je fiziološko djelovanje neurotrofina posredovano aktivacijom dvaju klasa transmembranskih receptora, Trk i p75^{NTR} (194). Tako mBDNF aktivira TrkB podtip receptora, dok p75^{NTR} receptore aktiviraju zrele forme neurotrofina, ali i njihovi prekursori (191).

Različiti stresni događaji mogu utjecati na promjene ekspresije BDNF u SŽS-u. Značajni porasti ekspresija mRNA, odnosno proteina BDNF, zabilježeni su u eksperimentalnim modelima konvulzija (195), moždanog udara (196), ozljede leđne moždine (197), kao i u eksperimentalnoj TBI (164, 198-200). Povećana ekspresija BDNF u eksperimentalnoj TBI povezana je s kognitivnim i funkcionalnim oporavkom ozljeđenih životinja (199, 201, 202), a zabilježena je i u pacijenata s TBI (203, 204).

1.3. Eksperimentalni modeli traumatske ozljede mozga

Tijekom posljednjih dvadesetak godina razvijeni su brojni eksperimentalni modeli TBI budući da je namjera se istraživača bila da, u laboratorijskim uvjetima, pokušaju reproducirati klinički iznimno heterogenu ozljedu. Iako ne postoji jedan model koji pokriva sve aspekte patofiziologije TBI, njihova upotreba značajno je povećala razumijevanje molekularnih i celularnih reakcija tkiva kao i neurobiheviornalnih ishoda nakon traume mozga.

1.3.1. Modeli žarišne traumatske ozljede mozga

Najpoznatiji modeli TBI kojima se žele istražiti promjene prilikom žarišne ozljede su model pada utega (engl. *weight drop model*) i model kontroliranog kortikalnog udara (engl. *controlled cortical impact, CCI*).

Model pada utega jedan je od prvih razvijenih modela ekperimentalne TBI (205, 206). U ovom se modelu koristi slobodno padajući uteg koji udara o lubanju anestezirane životinje (najčešće štakora ili miša). Težina ozljede može se regulirati povećanjem mase utega ili

promjenom visine s koje se otpušta uteg. Iako se radi o brzo izvedivom i jednostavnom modelu, značajan nedostatak je relativno slaba kontrola jačine ozljede, posebno ukoliko se želi uzrokovati teži stupanj ozljede koji je u ovom modelu često praćen frakturama lubanje, ali i tzv. sekundarnom, povratnom ozljedom.

U CCI modelu ozljeda se izaziva udarcem čvrstog impaktora u kraniotomijom eksponiranu, neoštećenu tvrdu ovojnicu mozga (207). Impaktor je kontroliran stlačenim zrakom, te se jakost udarca, odnosno vrijeme, brzina i dubina ozljede, mogu lako pratiti i podešavati. Ovaj tip ozljede može se izvoditi nad medijalnom linijom ili lateralnim korteksom. Za razliku od modela pada utega, CCI model sadrži u sebi i pojedine karakteristike difuznog oštećenja mozga.

1.3.2. Modeli difuzne traumatske ozljede mozga

Difuzna aksonalna ozljeda česta je upravo u teškoj kliničkoj TBI. U eksperimentalnim uvjetima reproducira se korištenjem modela akceleracijskog udarca (engl. *impact acceleration model*) (208). U ovom modelu koristi se pločica od nehrđajućeg čelika koja se postavlja na eksponiranu lubanju životinje. Na pločicu se otpušta slobodno padajući uteg, te se udarac preko nje ravnomjerno raspoređuje po lubanji, minimizirajući tako mogućnost fraktura kostiju lubanje. Životinja je prilikom pokusa anestetizirana i leži slobodno na pjenastoj podlozi što doprinosi akceleracijskom aspektu ozljede.

Cernak i sur. (209) razvili su noviji model difuzne TBI u kojem se također koristi na glavu životinje pričvršćeni čelični disk. Glava životinje u ovom modelu položena je u gelom ispunjen kalup u kojem se odvija deceleracija glave nakon udara zračnog vala o pločicu.

1.3.3. Kombinirani model žarišne i difuzne traumatske ozljede mozga

Model lateralne ozljede tlakom tekućine (engl. *lateral fluid percussion injury*, LFPI) uveden je 1989. godine (210). Jedan je od najčešće korištenih i najbolje karakteriziranih modela TBI koji sadrži karakteristike i žarišne i difuzne ozljede (211). Iako je mjesto udarca unilateralno, LFPI model uzrokuje bilateralnu ozljedu, kao i difuzno oštećenje bijele tvari, udaljeno od mjesta samog udarca (212-215). Radi se o klinički najrelevantnijem modelu TBI u štakora i miša koji omogućava proučavanje akutnih promjena u mozgu traumatiziranih životinja, ali i dugotrajnih bihevioralnih, fizioloških i histoloških ishoda (16).

1.4. Farmakoterapija traumatske ozljede mozga

1.4.1. Sadašnje stanje

Sadašnje stanje u farmakoterapiji TBI nije zadovoljavajuće, a ona uključuje prevenciju i liječenje sekundarnih oštećenja mozga, te opće potporne mjere intenzivnog liječenja (216). Iako je terapija TBI predmetom mnogobrojnih istraživanja, još uvijek u kliničkoj medicini ne postoje lijekovi dokazanog neuroprotektivnog djelovanja čijom bi se primjenom značajno smanjilo neuralno oštećenje i poboljšao ishod liječenja (217).

U pretkliničkim istraživanjima TBI, a s ciljem neuroprotekcije, testirani su različiti lijekovi koji imaju antioksidativna ili antioksidativna ili protuupalna djelovanja, ali do danas niti jedan pokušaj translacije rezultata tih istraživanja u kliničke studije nije se pokazao uspješnim (218). Mogući razlog neuspjeha testiranih lijekova u kliničkoj primjeni je heterogenost patofiziologije TBI. Stoga se sve više traga za učinkovitim, multifunkcionalnim lijekovima koji bi djelovali na različite štetne procese koji se odvijaju u sklopu TBI, a koji u eksperimentalnoj TBI još nisu izučavani ili nisu poznati mehanizmi njihova djelovanja (217).

1.4.2. Pioglitazon

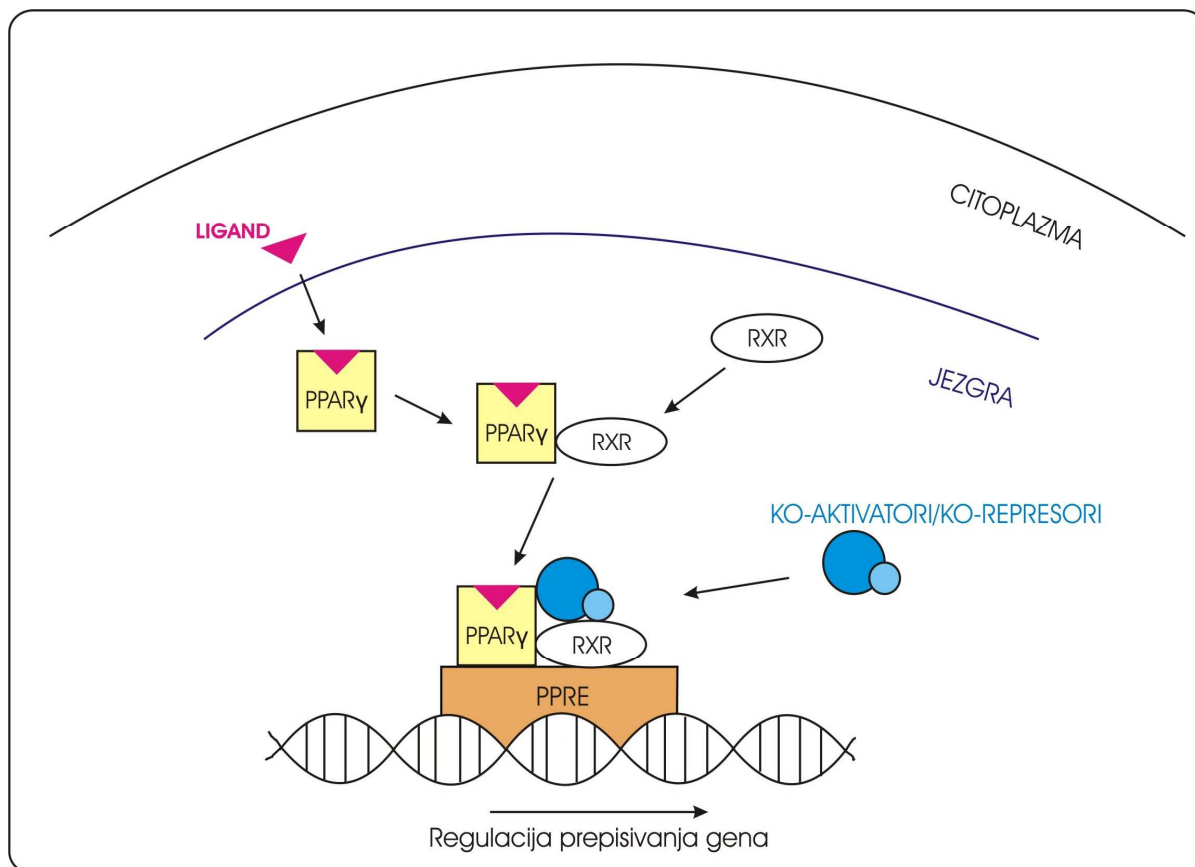
Peroksisom proliferator-aktivirani receptori (PPAR) dio su superobitelji nuklearnih receptora (219). Ovi receptori svoje učinke ostvaruju tako da, nakon vezanja liganda, heterodimeriziraju s retinoidnim X receptorom (RXR), te se nastali kompleksi, u kombinaciji s različitim ko-aktivatorima ili ko-represorima, vežu za peroksisom proliferator elemente odgovora (engl. *peroxisome proliferator response elements*, PPRE) na molekuli DNA (220, 221), putem kojih reguliraju prepisivanje gena koji kontroliraju metabolizam glukoze i lipida (Slika 3.).

Identificirane su tri različite izoforme PPAR, α , δ/β i γ , od kojih je izoforma PPAR γ do danas najbolje proučena. Ova je izoforma prvobitno identificirana kao ključni regulator diferencijacije adipocita, metabolizma lipida i homeostaze glukoze (222). Prirodni, endogeni ligandi PPAR γ su masne kiseline, prostaglandini i oksidirani derivati masnih kiselina. Osim metaboličkih, PPAR γ posreduju i druga biološka događanja, kao što su regulacija stanične diferencijacije, apoptoze i upale (222). Slika 3. prikazuje klasičan slijed događaja uzrokovan stimulacijom PPAR γ .

Tiazolidindioni (glitazoni) sintetski su ligandi PPAR γ koji se koriste u kliničkoj praksi kao oralni antidijabetici. Istraživanja učinjena unazad nekoliko godina pokazala su da najpoznatiji predstavnici skupine glitazona, pioglitazon i roziglitazon, djeluju neuroprotektivno u modelima Parkinsonove (223, 224) i Alzheimerove bolesti (225), fokalne moždane ishemije (226-228), ozljede leđne moždine (229-231), autoimunog encefalomijelitisa (232) i epileptičkog statusa (233).

Povoljni učinci PPAR γ agonista u navedenim entitetima objašnjavaju se njihovim protuupalnim, antioksidativnim i antiapoptotičkim djelovanjima (234).

Nekoliko je potencijalnih objašnjenja mehanizma protuupalnih učinaka PPAR γ agonista. Pokazano je da stimulacija PPAR γ može smanjiti aktivaciju mikroglije i makrofaga,



Slika 3. Aktivacija peroksisom proliferator aktiviranog receptora- γ (PPAR γ). Nakon vezanja liganda, heterodimerizacijom PPAR γ s retinoidnim X receptorom (RXR), nastaje aktivni transkripcijski kompleks koji se, uz dodatno povezivanje ko-aktivatora ili ko-represora, spaja na peroksisom proliferator elemente odgovora (PPRE), te regulira prepisivanje specifičnih ciljnih gena.

te spriječiti stvaranje i otpuštanje proupalnih medijatora (235-241). Nekoliko je potencijalnih objašnjenja mehanizma protuupalnih učinaka PPAR γ agonista. Jedno od tumačenja je PPAR γ -posredovana blokada ekspresije gena ovisnih o NF κ B transkripcijskom čimbeniku (223). Nadalje, PPAR γ može djelovati na transkripciju gena neovisno o vezanju na PPRE, odnosno direktnim povezivanjem s drugim transkripcijskim čimbenicima, kao što su nuklearni čimbenik aktiviranih T stanica (engl. *nuclear factor of activated T cells*, NF-AT), aktivacijski protein-1 (AP-1) ili prenositelji signala i aktivatori transkripcije (engl. *signal transducers and activators of transcription*, STAT) (222). Dodatno, stimulacija PPAR γ može inhibirati fosforilaciju mitogenom aktiviranih proteinskih kinaza (MAPK), a time i prevenirati o navednim kinazama ovisnu ekspresiju proupalnih gena (242).

Antioksidativni učinci stimulacije PPAR γ rezultat su različitih djelovanja. Naime, agonisti PPAR γ smanjuju ekspresiju COX-2 (226, 243, 244) i iNOS (244), enzima koji posreduju u stvaranju ROS, odnosno RNS. Nadalje, pokazano je da lijekovi ove skupine značajno djeluju na razine ekspresije i aktivnosti pojedinih antioksidativnih enzima, odnosno na sadržaj ne-enzimskih antioksidativnih molekula (226, 243, 245-247).

Antiapoptotički učinci agonista PPAR γ moguće su rezultat prethodno opisanih protuupalnih i antioksidativnih djelovanja, ali i direktnih djelovanja na mehanizme programirane stanične smrti. Tako, primjerice, aktivacijom PPAR γ potiče se transkripcija anti-apoptotičkih čimbenika kao što su Bcl-2 (248, 249) i 14-3-3 ϵ (250).

Učinci primjene glitazona u eksperimentalnoj TBI do sad su proučavani u tri studije. Yi i sur. (251) te Thal i sur. (252) istraživali su učinke roziglitazona u CCI modelu TBI. U prvoj studiji, navedenim su lijekom ostvareni povoljni učinci posredovani protuupalnim i antioksidativnim mehanizmima, dok rezultati potonjeg istraživanja ne doprinose tvrdnjama o potencijalnom neuroprotektivnom djelovanju ovog specifičnog PPAR γ agonista. Sauerbeck i sur. (253) i Thal i sur. (252) istraživali su učinke primjene pioglitazona u istom eksperimentalnom modelu TBI. Rezultati navedenih studija govore u prilog protektivnog učinka pioglitazona u CCI modelu TBI, a koje je najvjerojatnije rezultat njegovog protuupalnog djelovanja.

Za razliku od roziglitazona, koji je selektivan agonist PPAR γ , pioglitazon dodatno stimulira i PPAR α , te se pojedini protuupalni učinci ovog glitazona objašnjavaju aktivacijom potonje izoforme navedenih nuklearnih receptora (254). Pioglitazon se razlikuje od roziglitazona i u jakosti, odnosno razini afiniteta prema PPAR γ . Naime, pioglitazon ostvaruje antioksidativne i protuupalne učinke u znatno nižim dozama od roziglitazona, koji ima oko sedam puta jači afinitet prema PPAR γ (226).

1.4.3. Enoksaparin

Enoksaparin, heparin niske molekularne mase (engl. *low molecular weight heparin*, LMWH), primjenjuje se u kliničkoj medicini s ciljem prevencije duboke venske tromboze i plućne embolije, te u liječenju akutnih žilnih tromboza (255). Antikoagulantni učinak enoksaparin ostvaruje poticanjem aktivnosti antitrombina III. Ovaj antikoagulans u eksperimentalnoj TBI smanjuje moždani edem i veličinu lezije, te poboljšava neurološki i kognitivni status ozljeđenih životinja (256, 257). Točan mehanizam neuroprotektivnog učinka enoksaparina u eksperimentalnoj traumi mozga zasad nije razjašnjen.

Smatra se da su enoksaparinom uzrokovana inhibicija razvoja posttraumatske mikrotromboze (258), te stvaranja i štetnih djelovanja trombina potencijalno važni mehanizmi smanjenja neuronalne ozljede (259). No, osim antikoagulantnih, ovaj LMWH posjeduje i ne-antikoagulantne učinke, poput protuupalnih i antioksidativnih djelovanja (257).

U odnosu na heparin, koji također ima neke od navedenih farmakoloških osobitosti, enoksaparin ima 6 puta manju antitrombinsku i upola manju anti-Xa aktivnost. Ove osobitosti čine ga sigurnijim spojem za uporabu u kliničkim uvjetima, te je stoga primjena enoksaparina povezana s nižim rizikom od krvarenja (257). Enoksaparin ima bolju bioraspoloživost i dulji poluvijek života, te predvidljiviji odnos doza-odgovor od heparina (257). U *in vitro* pokusima, u normoksičnim uvjetima, enoksaparin u visokim koncentracijama prolazi KMB, za razliku od heparina koji nema tu sposobnost (257). Nadalje, tijekom hipoksije, često prisutne u tkivu mozga nakon traumatske ozljede, značajno se povećava propusnost KMB prema enoksaparinu (257).

2. Ciljevi istraživanja

Iz prethodno navedenog u Uvodu i pregledu područja istraživanja ovog doktorskog rada razvidno je: 1. da sadašnja znanja o mehanizmima oštećenja i oporavka mozga nisu cjelovita, 2. da učinci i mehanizmi djelovanja pioglitazona i enoksaparina u eksperimentalnoj TBI nisu u cjelosti poznati.

Stoga ciljevi istraživanja u ovom doktorskome radu, u modelu TBI, u štakora, jesu:

1. odrediti stupanj oksidativnog oštećenja lipida i proteina u različitim regijama mozga (parijetalni i entorinalni korteksi, hipokampus, talamus, cerebellum),
2. evaluirati aktivnosti antioksidativnih enzima, SOD i GSH-Px u gore navedenim moždanim strukturama,
3. odrediti razine ekspresija proteina od interesa (proupalnih čimbenika COX-2 i iNOS, kao i I κ B α , te BDNF i HSP70) u gore navedenim moždanim strukturama,
4. evaluirati sadržaj vode u različitim moždanim strukturama,
5. odrediti obrazac oštećenja tkiva i neuronalne degeneracije,
6. istražiti učinke pioglitazona i enoksaparina na istraživane pokazatelje oksidativnog stresa i razine ekspresija proteina od interesa.

3. Materijal i metode

3.1. Materijal

3.1.1. Pokusne životinje i etički aspekti istraživanja

Svi pokusi učinjeni su na odraslim Hannover-Wistar štakorima muškog spola, tjelesne mase 350 do 450 g. Životinje su hranjene standardnom hranom za štakore i pile su vodovodnu vodu *ad libitum*. Živjele su u uvjetima pravilnog izmjenjivanja razdoblja 12-satne svjetlosti i tame, pri stalnoj sobnoj temperaturi od 20 °C.

Svi postupci na životinjama bili su provedeni sukladno zakonskim odredbama Republike Hrvatske (Zakon o dobrobiti životinja, NN19/99; Pravilnik o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa, NN 176/2004). Istraživanja su bila provedena sukladno bioetičkim standardima o provođenju pokusa na životinjama uz izbjegavanje nepotrebnih pokusa i patnje životinja, te u skladu s osnovama tzv. 3R pristupa: *Replacement* = nadomještanje životinja, *Reduction* = smanjenje broja životinja, *Refinement* = oplemenjivanje postupaka prema životinjama.

3.1.2. Lijekovi

U pokusima su korišteni sljedeći lijekovi: pioglitazon (Axxora, LLC, San Diego, CA, SAD), enoksaparin (Aventis Pharma Spécialités Maison-Alfort, Cedex, Francuska), bupivakain (Marcaine[®], AstraZeneca, Södertälje, Švedska), izofluran (Abbott Laboratories Ltd, Queenborough, UK), natrijev tiopental (Specia, Pariz, Francuska).

3.1.3. Kemikalije

RANSOD kit za određivanje aktivnosti SOD i RANSEL kit za mjerenje aktivnosti GSH-Px nabavljeni su od Randox Laboratories Ltd. (Crumlin, UK). OxyBlot[™] Protein Oxidation Detection Kit kupljen je od Chemicon International (Temecula, CA, SAD).

Supstrat za mjerenje proteina dobavljen je od Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, SAD). Sve ostale kemikalije nabavljene su od Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, SAD), osim ako je drukčije navedeno.

3.1.4. Primarna protutijela

Za Western blot i imunohistokemijske analize korištena su primarna protutijela navedena u tablici 1.

Tablica 1. Korištena primarna protutijela

Epitop	Domaćin i klonalnost	Proizvođač	Primjena
COX-2	kozje poliklonsko	Santa Cruz Biotechnology, SAD	WB
COX-2	zečje poliklonsko	Abcam, Cambridge, UK	IHC
HSP70	mišje monoklonsko	Abcam, Cambridge, UK	WB
HSP70	mišje monoklonsko	Santa Cruz Biotechnology, SAD	IHC
iNOS	zečje poliklonsko	Santa Cruz Biotechnology, SAD	WB
IκBα	zečje monoklonsko	Abcam, Cambridge, UK	WB
BDNF	zečje monoklonsko	Abcam, Cambridge, UK	WB

Skraćenice: WB, Western blot; IHC, imunohistokemija

3.1.5. Sekundarna protutijela

Za Western blot i imunohistokemijske analize korištena su sekundarna protutijela navedena u tablici 2.

Tablica 2. Korištena sekundarna protutijela

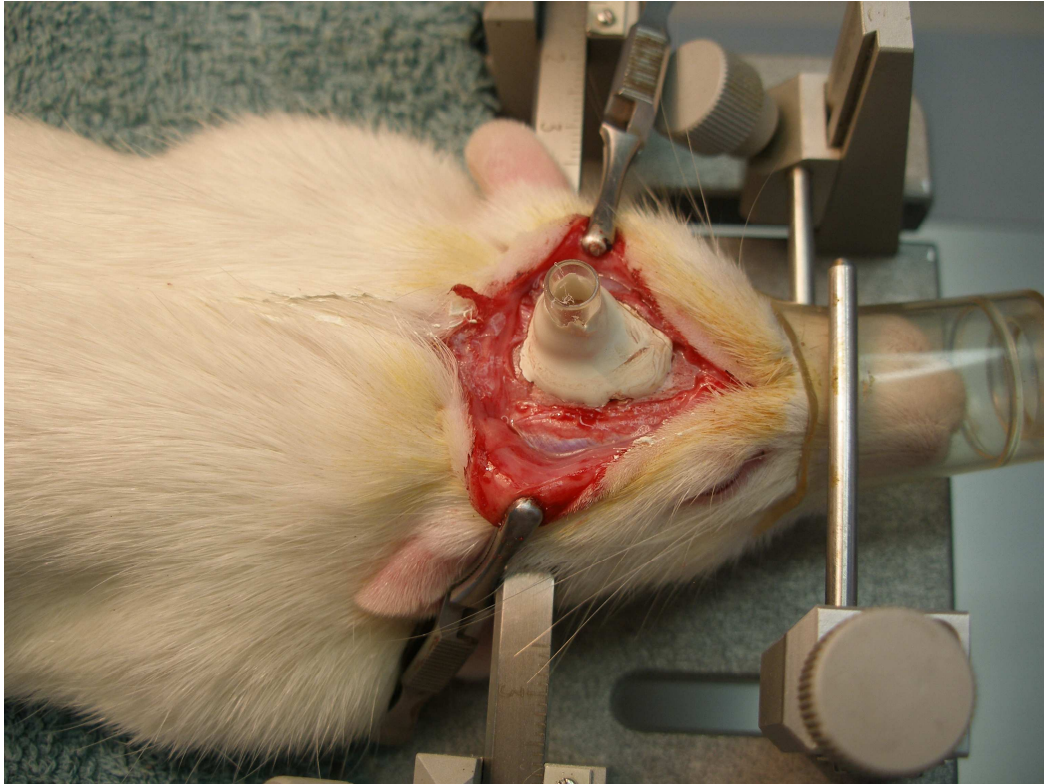
Epitop	Domaćin i klonalnost	Proizvođač	Primjena
mišji imunoglobulini	kozje poliklonsko	Dako Cytomation, Glostrup, Danska	WB, IHC
kozji imunoglobulini	zečje poliklonsko	Dako Cytomation, Glostrup, Danska	WB
zečji imunoglobulini	kozje monoklonsko	Dako Cytomation, Glostrup, Danska	WB, IHC

Skraćenice: WB, Western blot; IHC, imunohistokemija

3.2. Metode

3.2.1. Traumatska ozljeda mozga u štakora

Eksperimentalna trauma mozga u štakora učinjena je LFP modelom ozljede (210). Životinje su anestezirane izofluranom, u smjesi kisika i dušikovog oksida, u omjeru 2:1, u koncentraciji od 4 % prilikom indukcije, odnosno 2 % tijekom održavanja anestezije. Potom su smještene na aparat za stereotaksiju, koža im je bila dezinficirana, a supkutano (s.c.) ubrizgana 0,5 %-tna otopina bupivakaina. Nakon učinjenog sagitalnog reza kože, prikazane su kosti lubanje, te je trepanacijskim svrdlom učinjen otvor u lubanji promjera 5 mm, pazeći pritom da se očuva tvrda ovojnica mozga. Kraniotomija je učinjena iznad lijevog parijetalnog korteksa, 3,4 mm lateralno od sagitalne suture i na sredini između koronalnog i lambdoidnog šava. U mjesto otvora epiduralno je smještena, a potom, pomoću akrilnog ljepila i dentalnog cementa, fiksirana šuplja plastična spojnica tipa Luer-Lok (Slika 4.). Slobodni kraj navedenog plastičnog nastavka ispunjen je fiziološkom otopinom (0,9 % NaCl) i spojen na LFP aparat neposredno prije izazivanja traume mozga. Prije indukcije LFP ozljede, životinjama je prekinuta opća anestezija, odnosno TBI je izazvana u trenutku kada je životinja pokazala prvi znak povratka svijesti.



Slika 4. Anestezirana životinja položena na aparat za stereotaksiju. Plastična spojica tipa Luer Lok fiksirana je epiduralno nad lijevim parijetalnim korteksom.



Slika 5. Sustav za LFP ozljedu u štakora: aparat za LFP ozljedu (A), osciloskop (B), računalo (C).

TBI u štakora umjerene jakosti inducirana je pomoću aparata za LFP ozljedu (VCU Biomedical Engineering Facility, Richmond, VA, SAD) (Slika 5.). Aparat se sastoji od dugačkog cilindra napravljenog od pleksiglasa i ispunjenog fiziološkom otopinom. Na jednom kraju cilindra smješten je pomični klip. Udarom bata o klip stvara se val tekućine koji putuje duž cilindra do drugog kraja, na kojem je smještena životinja. Snaga vala prenosi se preko tvrde ovojnice na tkivo mozga, te uzrokuje ozljedu. Na istom kraju aparata na kojem je smještena životinja, pričvršćen je i pretvornik, naprava koja omogućava praćenje promjena tlaka tekućine u sustavu. Naime, promjena tlaka tekućine u cilindru pomoću pretvornika prenosi se u digitalni oblik, te se nastali val prati na računalno podržanom osciloskopu (PCS500, Velleman[®] Instruments, Gavere, Belgija). Ovakav sustav analogno-digitalnog praćenja omogućava precizno doziranje intenziteta same ozljede, te je ona u ovom modelu TBI visoko reproducibilna. U našim uvjetima, TBI umjerene jakosti bila je uzrokovana korištenjem tlaka tekućine 1,8 - 2,2 atm (1,82 - 2,23 bara).

Nakon indukcije ozljede, životinje su bile apnoične, a u daljnje analize su uključene samo one kod kojih prestanak disanja nije trajao dulje od 60 sekundi. Nakon povratka svijesti, životinje su bile ponovno anestetizirane primjenom izoflurana, uklonjen im je plastični nastavak, a potom svilenim šavom zatvorena koža glave. Na ranu je potom primijenjena antibiotska mast, a štakori su vraćeni u svoje kaveze. Sat vremena nakon operacije svim životinjama bilo je intraperitonealno (i.p.) injicirano 5 mL fiziološke otopine, te im je potom omogućen slobodan pristup hrani i vodi. Lažno operirane životinje bile su tretirane identično, osim što im nije bila izazvana ozljeda mozga. U dijelu pokusa u kojima su proučavani pokazatelji oštećenja mozga štakora podvrgnutih traumatskoj ozljedi, navedene su životinje predstavljale kontrolnu skupinu.

3.2.2. Tretman lijekovima

U dijelu pokusa u kojima su proučavani učinci pioglitazona u TBI, traumatizirane životinje jednokratno su, i.p., tretirane navedenim glitazonom, u dozi od 1 ili 3 mg/kg, 10 minuta nakon indukcije TBI. Životinjama kontrolne skupine aplicirano je otapalo, dimetil-sulfoksid, 10 minuta nakon lažne TBI. Štakori su žrtvovani 24 sata (za biokemijske, histokemijske i imunohistokemijske analize) ili 48 sati nakon izazivanja traume mozga (u svrhu određivanja postojanja posttraumatskog edema mozga).

U dijelu pokusa u kojima su istraživani učinci enoksaparina u TBI, pokusne su životinje bile s.c. tretirane istraživanim lijekom, u dozi 1 mg/kg 1 sat nakon indukcije TBI, te s dodatnih 7 doza, primijenjenih svakih 6 sati nakon prve doze. Štakori kontrolne skupine bili su lažno ozlijeđeni, a otapalo (voda za injekcije) im je injicirano u navedenim vremenskim intervalima nakon TBI. Sve životinje u ovom dijelu istraživanja bile su žrtvovane 48 sati nakon izazivanja TBI.

3.2.3. Biokemijske analize

3.2.3.1. Priprema uzoraka mozga za biokemijske analize

Za biokemijske analize, životinje su žrtvovane dekapitacijom, odstranjeni su im mozgovi, stavljeni na led, te su odvojene ipsilateralne regije mozga. Uzorci tkiva brzo su smrznuti na suhom ledu i pohranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do vremena analize. Odmrznuti uzorci tkiva pojedinih regija homogenizirani su na ledu pomoću ultrazvučnog homogenizatora (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, SAD) u 20 mM Tris-HCl puferu, pH 7,4 (omjer mase tkiva i volumena pufera 1:10). Alikvoti od po 150 μL homogenata su odvojeni za određivanje razina produkata lipidne peroksidacije i pohranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize. Ostatak homogenata potom je centrifugiran 10 minuta u rashlađenoj ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) centrifugi (Centurion Scientific, West Sussex, UK) na $14000 \times g$. Nadsloj je odvojen i ponovno zamrznut na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, a kasnije upotrijebljen za određivanje aktivnosti SOD i GSH-Px, te koncentracija proteina.

3.2.3.2. Priprema uzoraka mozga za Western blot analize

U svrhu određivanja stupnja oksidativnog oštećenja proteina i ekspresije različitih proteina od interesa u istraživanim regijama mozga štakora korištena je Western blot analiza. Životinje su žrtvovane dekapitacijom, odstranjeni su im mozgovi, stavljeni na led, te su odvojene ipsilateralne regije mozga. Uzorci tkiva brzo su smrznuti na suhom ledu i pohranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do vremena analize. Nakon odmrzavanja, uzorci su homogenizirani ultrazvučnim homogenizatorom u puferu za lizu (25 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 10 mM NaPP, 10 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF, 24 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ leupeptina, 35 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ aprotinina, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS), inkubirani 1 sat na ledu, te centrifugirani na $10000 \times g$ 10 minuta na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Alikvoti nadsloja pohranjeni su na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do vremena analize.

3.2.3.3. Određivanje razine produkata lipidne peroksidacije

Razine produkata lipidne peroksidacije u homogenatima tkiva određivane su spektrofotometrijskim mjerenjem reakcijskih proizvoda tiobarbiturne kiseline (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) pomoću metode koju su prvi opisali Ohkawa i sur. (260), uz preinake po Callawayu i sur. (261). Homogenati tkiva (150 μL) inkubirani su sa 75 μL 8,1 % natrij dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulphate*, SDS) 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom im je dodano 925 μL 20 % acetatnog pufera (pH 3,5 s 5 M NaOH). Uzorci su centrifugirani na $10000 \times g$ 15 minuta. Alikvotima nadslojeva od po 1 mL dodan je isti volumen 0,8 % tiobarbiturne kiseline, a potom su uzorci inkubirani u vodenoj kupelji 1 sat na $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon hlađenja uzoraka na ledu, dodana su 2 mL mješavine n-butanola i piridina (15:1, v/v), a TBARS su ekstrahirani centrifugiranjem na $2200 \times g$ 10 min. Apsorbancija organskog nadsloja očitana je na $\lambda = 532\text{ nm}$. Vrijednosti dobivene za slijepu probu (za koju je umjesto uzorka korišten pufer za pripremu uzoraka) oduzete su od

svih dobivenih mjerenja za uzorke. Malondialdehid (MDA) korišten je kao vanjski standard pomoću kojeg je napravljena kalibracijska krivulja.

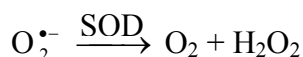
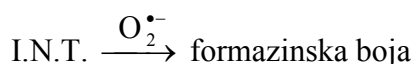
3.2.3.4. Određivanje stupnja oksidativnog oštećenja proteina

Stupanj oksidativnog oštećenja proteina određivan je mjerenjem sadržaja proteinskih karbonilnih skupina Western blot analizom. Pritom je korišten OxyBlot™ kit (Chemicon International, Inc., Temecula, CA, SAD) prema uputama proizvođača.

Uzorci proteina (5 µL, koncentracija proteina normalizirana na 4 µg/µL), 5 µL 12 % SDS i 10 µL 20 mM 2,4-dinitrofenilhidrazona (2,4-DNPH) inkubirani su 15 minuta na sobnoj temperaturi. Derivatizacija uzoraka s 2,4-DNPH zaustavljena je dodavanjem 7,5 µL neutralizacijske otopine (2 M Tris u 30 % glicerolu). Uzorci su potom razdvojeni elektroforezom na 10 % poliakrilamidnom gelu, te prenešeni na nitroceluloznu membranu. Nespecifična vezna mjesta na membranama blokirana su 1 % otopinom govedeg serumskog albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA) u Tris puferiranoj fiziološkoj otopini (engl. *Tris-buffered saline*, TBS), pH 7,5 s Tween 20 (0,1 %) (TTBS) 1 sat na sobnoj temperaturi, a potom inkubirana preko noći na 4 °C s primarnim zečjim anti-DNP protutijelom (1:150 u 1 % otopini BSA u TTBS). Sljedeći dan je membranama dodano sekundarno kozje protu-zečje protutijelo konjugirano s peroksidazom iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, membrane su vizualizirane kemiluminiscencijom, korištenjem supstrata Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, SAD), pomoću sustava za *imaging*, opremljenog programom za denzitometrijsku analizu (Kodak Image Station 440CF i Kodak 1D Image Analysis Software, oboje Eastman Kodak, Rochester, NY, SAD).

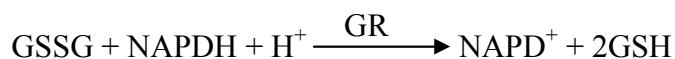
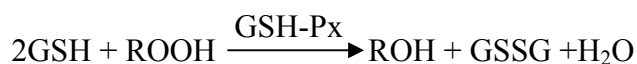
3.2.3.5. Određivanje razina aktivnosti antioksidativnih enzima

Aktivnost SOD određivana je metodom po McCordu i Fridovichu (33), korištenjem komercijalno dostupnog RANSOD kita, proizvođača Randox Laboratories Ltd. (Crumlin, UK). U ovoj metodi koriste se ksantin i ksantin oksidaza (XO) kako bi se stvorili superoksidni radikali koji potom reagiraju s 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijevim kloridom (I.N.T.), te nastaje crvena formazinska boja. Enzim prisutan u uzorku natječe za se s I.N.T. za superoksidne radikale i time sprječava stvaranje boje. Aktivnost SOD mjeri se sukladno stupnju inhibicije ove reakcije, a prati se spektrofotometrijski na $\lambda = 505 \text{ nm}$.



Reakcijska smjesa volumena 1 mL sadrži 0,05 mM ksantina, 0,025 mM I.N.T., 40 mM CAPS (pH 10,2) i 0,94 mM EDTA. Reakcija započinje istovremenim dodavanjem 50 μL uzorka i 150 μL XO (80 U/L) u zagrijanu (37 °C) reakcijsku smjesu. Nakon 30 sekundi, očitava se početna, a nakon dodatne 3 minute završna apsorbancija. Pročišćena goveđa eritrocitna SOD korištena je u jednakim uvjetima kako bi se izračunala kalibracijska krivulja. Svi su uzorci razrijeđeni s 0,01 M fosfatnim puferom, pH 7,0, kako bi postotak inhibicije iznosio između 30 % i 60 % od neinhibirane reakcije. Jedinica enzimske aktivnosti definirana je kao količina enzima potrebna za 50 % inhibiciju promjene apsorbancije po minuti u odnosu na neinhibiranu reakciju.

Aktivnost GSH-Px određivana je metodom koju su opisali Paglia i Valentine (63). Analize su bile učinjene pomoću komercijalnog RANSEL kita proizvođača Randox Laboratories Ltd. (Crumlin, UK). Istraživani enzim katalizira redukciju kumena hidroperoksida uz istodobnu oksidaciju GSH. U prisustvu glutation reduktaze (GR) i NADPH, oksidirani GSH se trenutno reciklira u reduciranu formu uz popratnu oksidaciju NADPH u NADP^+ .



Ova se reakcija prati spektrofotometrijski, a očituje se kao smanjenje u apsorbanciji na $\lambda = 340 \text{ nm}$. Stupanj smanjenja apsorbancije direktno je proporcionalan s aktivnosti GSH-Px u uzorku. Reakcijska smjesa volumena 1 mL, koja sadrži 4 mM GSH, 0,5 U/L GR i 0,34 mM NADPH u 0,05 M fosfatnom puferu (pH 7,2) s 4.3 mM EDTA, prethodno je zagrijana na 37 °C, a reakcija započinje istodobnim dodavanjem 40 μL kumena hidroperoksida (0,18 mM) i 20 μL uzorka. Početna apsorbancija bilježi se nakon prve, a krajnja nakon dodatne 2 minute. Jedinica aktivnosti GSH-Px definirana je kao količina enzima potrebna da stvori 1 μmol NADP^+ iz NADPH u minuti, uz korištenje ekstincijskog koeficijenta za NADPH od 6220 (M cm)⁻¹ na 340 nm. Vrijednosti dobivene za slijepu probu (za koju se umjesto uzorka koristi pufer za pripremu uzoraka) oduzete su od svih zabilježenih mjerenja za uzorke.

3.2.3.6. Western blot analize razine ekspresija proteina

Razine ekspresija različitih proteina od interesa u tkivnim lizatima određivane su metodom Western blot. Pripremljeni uzorci, u kojima su koncentracije proteina bile normalizirane na 3 ili 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, razdvojeni su elektroforezom, te preneseni na nitroceluloznu membranu. Nakon blokiranja nespecifičnih veznih mjesta na membranama pomoću odgovarajućeg pufera za blokiranje, dodana su primarna protutijela te su membrane inkubirane preko noći na 4 °C. Drugi dan primijenjena su odgovarajuća biotinilirana sekundarna protutijela tijekom 1 sata, a potom tijekom 30 minuta konjugat streptavidin-HRP, sve na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, membrane su vizualizirane kemiluminiscencijom korištenjem supstrata Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, SAD). Kemiluminiscentna detekcija i kvantifikacija

jačine signala učinjena je pomoću sustava za *imaging*, opremljenog programom za denzitometrijsku analizu (Kodak Image Station 440CF i Kodak 1D Image Analysis Software, oboje Eastman Kodak, Rochester, NY, SAD).

3.2.3.7. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracije proteina u uzorcima određivane su metodom po Bradfordu (262), korištenjem pročišćenog BSA kao standarda.

3.2.4. Histokemijske i imunohistokemijske metode

3.2.4.1. Priprema mozgova za histološke analize

Patohistološke i imunohistokemijske metode učinjene su na parafinskim preparatima mozgova pokusnih životinja. Prilikom žrtvovanja, natrijevim tiopentalom uspavane životinje, transkardijalno su perfundirane hladnom puferiranom fiziološkom otopinom, te prefiksirane 4 % paraformaldehidom. Nakon preparacije, mozgovi su uronjeni u navedeni fiksativ tijekom sljedeća 20 do 24 sata. Parafinski preparati su pripremljeni dehidracijom tako pripremljenih mozgova tretirajući tkivo rastućim koncentracijama alkohola (od 50 % do 100 %), ksilolom i parafinom tijekom 24 sata, nakon čega su pohranjeni na sobnoj temperaturi. Učinjeni su koronalni rezovi debljine 3-4 μm koji su se potom koristili za histokemijske i imunohistokemijske analize.

3.2.4.2. Histokemijske analize

Za detekciju obrasca oštećenja tkiva i neuronalne degeneracije korištena su uobičajena bojanja hematoksilin-eozin i krezil violet.

3.2.4.3. Imunohistokemijske metode

Regionalne distribucije ekspresija COX-2 i HSP70 analizirane su imunohistokemijski. Stakalca s rezovima mozгова prvo su deparafinizirana uranjanjem u ksilol, a zatim rehidrirana kroz padajuće koncentracije etanola (od 100 % do 70 %) do destilirane vode. Sekcije na kojima je analizirana ekspresija COX-2 podvrgnute su toplinom induciranom razotkrivanju epitopa korištenjem mikrovalne pećnice i citratnog pufera (10 mM, pH 6,0). Nakon hlađenja i blokiranja endogene peroksidazne aktivnosti 3 % H₂O₂, svi uzorci su inkubirani s 5 % normalnim kozjim serumom (engl. *normal goat serum*, NGS) tijekom 1 sata, a zatim su primijenjena primarna protutijela (anti-COX-2 1:200, anti-HSP70 1:100), razrijeđena u 5 % NGS/1 % BSA/TBS-Triton X-100 (0,025 %), preko noći na 4 °C. Sljedeći dan sekcije su inkubirane s odgovarajućim biotiniliranim sekundarnim protutijelima (protu-zečje 1:800, protu-mišje 1:200), razrijeđena u 5 % NGS/1 % BSA/TBS-Triton X-100 (0,025 %), 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon toga primijenjen je streptavidin-HRP konjugat, 30 minuta na sobnoj temperaturi. Sekcije su razvijene korištenjem kromogena diaminobenzidina (DAB) koji reakcijom s HRP stvara smeđi precipitat.

Kao negativne kontrole u svim imunohistokemijskim bojanjima korišteni su histološki rezovi na koje je umjesto primarnih protutijela nanesen pufer za razrjeđivanje protutijela.

Fotografije koronalnih rezova preparata mozga učinjene su pomoću Olympus DP70 kamere na Olympus BX51 mikroskopu (oboje Olympus, Japan).

3.2.5. Mjerenje edema mozga

Za potrebe testiranja učinaka traume na razvoj edema mozga, štakori su žrtvovani 48 sati nakon LFP ili lažne ozljede mozga. Mozgovi su brzo izvađeni te smješteni u matricu za mozak (Stoelting, Chicago, IL, SAD) kako bi se što točnije odijelili dijelovi mozga. Mozgovi su prvotno rezani koronalnim rezom na poziciji bregma minus 1 mm (263) kako bi se odvojio frontalni mozak (koji sadrži frontalni korteks, bazalne ganglije i prednji bazalni dio mozga),

koji je potom sagitalnim rezom odvojen na ipsilateralni (lijevi) i kontralateralni (desni) dio. Ostatak mozga je potom diseciran kako bi se odvojili korteksi i hipokampusi. Kortikalni dio je odvojen zajedno s eksternom kapsulom od podliježećeg hipokampusa ventralno do rinalne fisure. Cijeli hipokampusi obje strane mozga odvojeni su od ostatka mozga. Nadalje je odvojen cijeli cerebelum, a prekolikularnom transekcijom je odvojeno i moždano deblo. Nakon disekcije, svaka regija je smještena na komade aluminijske folije i izvagana na mikrovazi (Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD) ("mokra masa"). Potom su uzorci smješteni u ventilacijsku pećnicu na 100 °C tijekom 24 sata (264). Nakon isteka vremena, regije mozga su ponovno izvagane ("suha masa"). Od svih izmjerenih masa oduzeta je masa folije. Postotak sadržaja vode u moždanom tkivu izračunat je prema sljedećoj formuli:

$$\frac{\text{"mokra masa"} - \text{"suha masa"}}{\text{"mokra masa"}} \times 100$$

3.3. Statistička obrada podataka

Prikupljeni podaci pohranjeni su u bazu podataka korištenjem programa Microsoft Office Excell® (Microsoft Corp., Redmond, WA, SAD). Dobiveni podaci izraženi su kao mjere središnjice i raspršenja. Pri statističkoj obradi podataka uspoređivane su vrijednosti varijabli među skupinama pri čemu su korišteni parametrijski ili neparametrijski postupci statističke raščlambe, ovisno o rezultatima testiranja normalnosti razdiobe podataka. Razina od $P < 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Postupci statističke raščlambe učinjeni su pomoću računalne programske potpore STATISTICA® inačica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

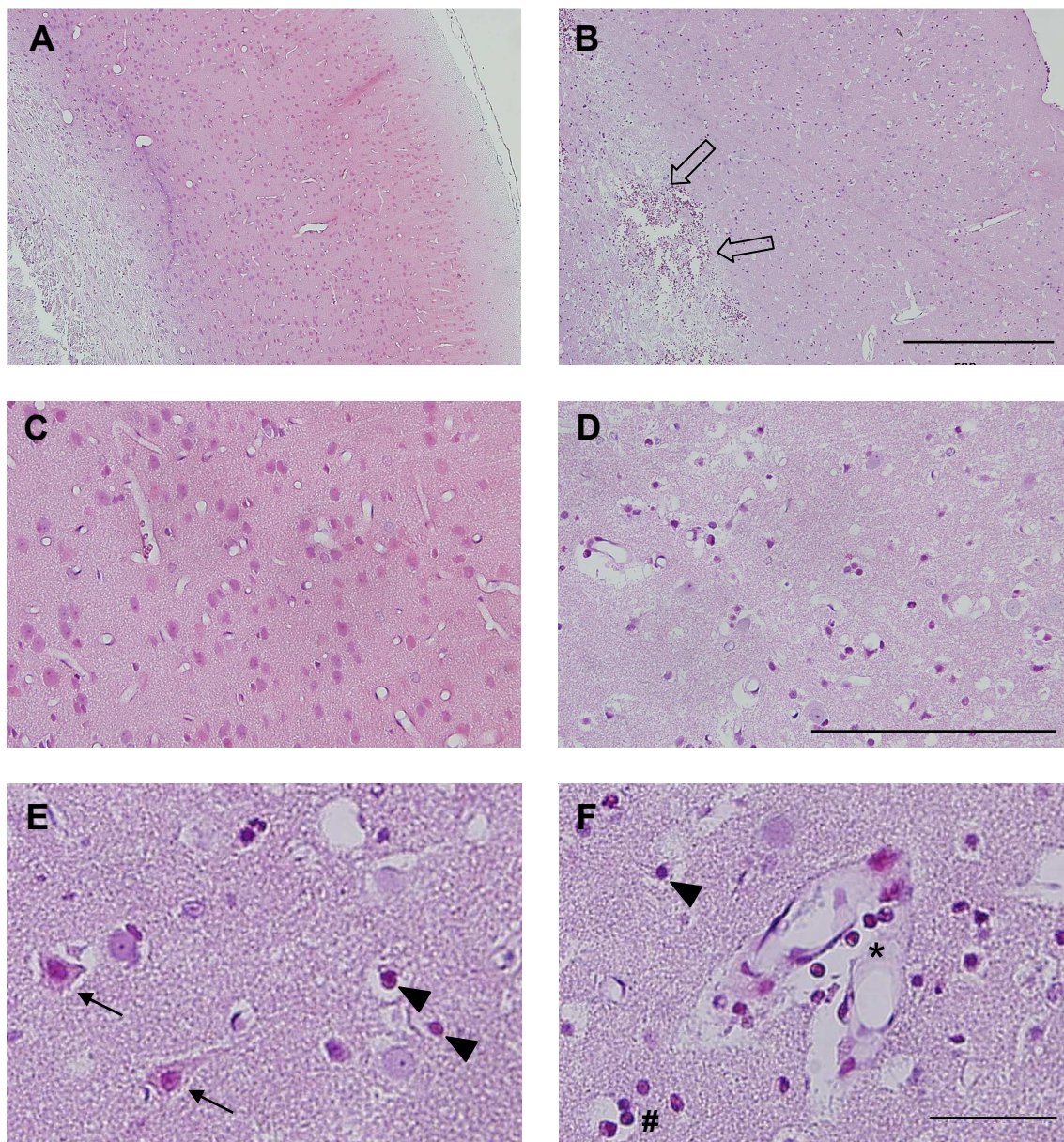
4. Rezultati

4.1. Moždano oštećenje i endogena neuroprotekcija u traumatskoj ozljedi mozga u štakora

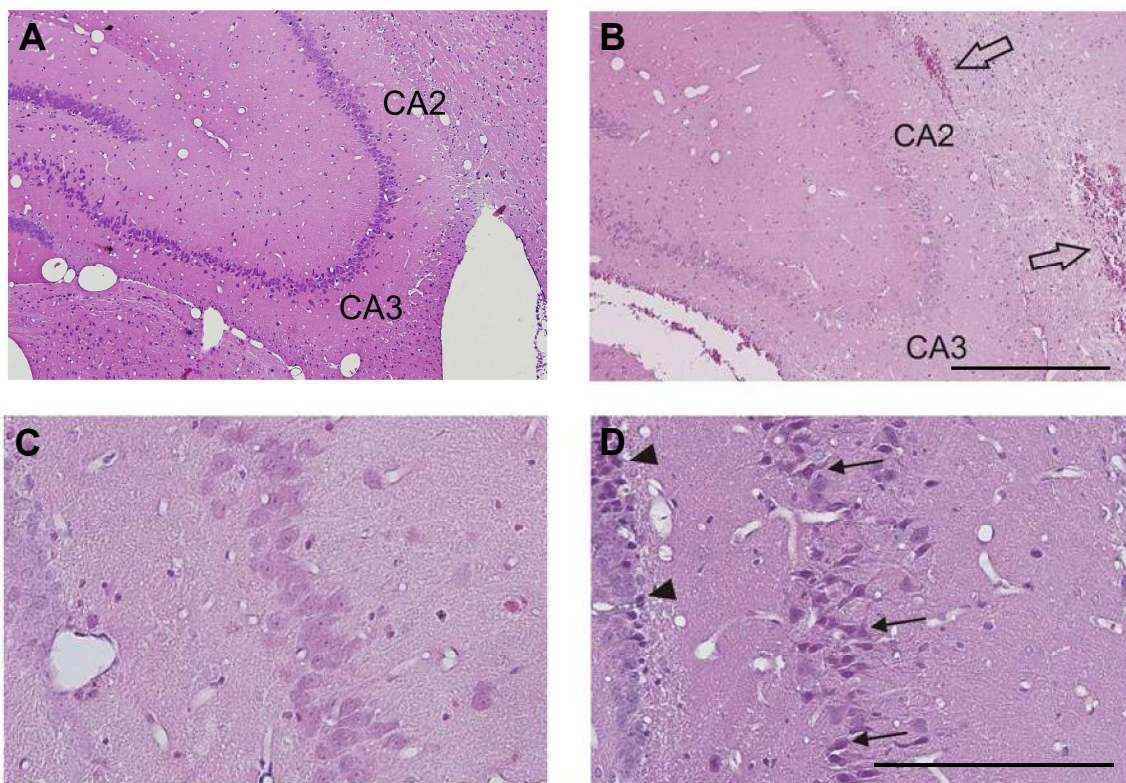
4.1.1. Histološke analize moždanih promjena nakon traumatske ozljede mozga u štakora

Korištenjem standardnih histoloških, hematoksilin i eozin (Slike 6., 7. i 8.), odnosno, za neuralna tkiva specifičnog, krezil violet (Slika 9.) bojanja, analizirali smo promjene prisutne u mozgu štakora 24 sata nakon indukcije eksperimentalne TBI. Traumatska ozljeda uzrokovala je značajno oštećenje tkiva mozga. Najjače oštećenje opaža se u ipsilateralnom parijetalnom korteksu (Slika 6.) u kojem su vidljivi edem, intraparenhimna krvarenja, mjestimični razdori tkiva, te značajan gubitak stanica, prije svega neurona, kao i infiltracija upalnih stanica u ozlijeđeno tkivo. Na preparatima mozгова ozlijeđenih životinja vidljive su piknotičke jezgre mrtvih neurona, te degenerirajući, eozinofilni neuroni, trokutastog oblika. Gubitak neurona je zamjetan i u hipokampusu (Slika 7.), s time da su najviše oštećene CA2 i CA3 regije ove moždane strukture. Znakovi neurodegeneracije zamjećuju se i u području talamusa (Slika 8.).

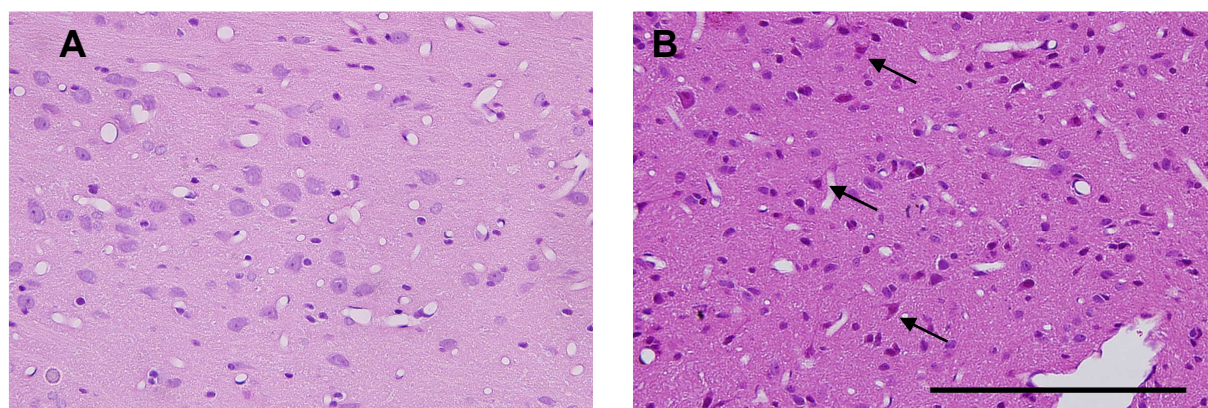
Na preparatima obojanim krezil violetom također je zabilježen značajan gubitak neurona u ipsilateralnom parijetalnom korteksu, te u CA2 i CA3 regiji ipsilateralnog hipokampusa (Slika 9.).



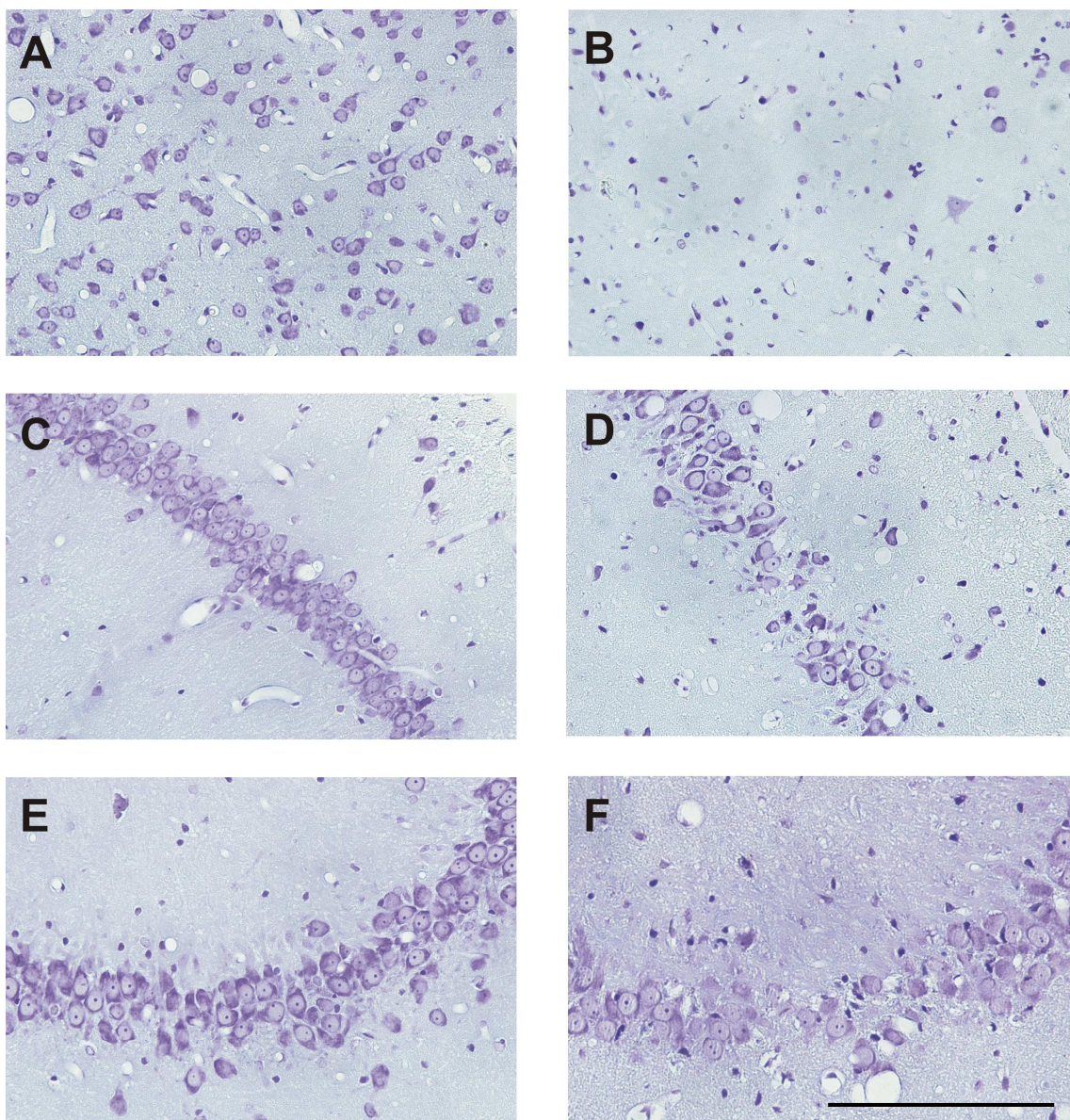
Slika 6. Mikrofotografije hematoksilinom i eozinom obojanih preparata koronalnih sekcija parijetalnih korteksa štakora kontrolne skupine (A, C, E) i životinja podvrgnutih eksperimentalnoj traumatskoj ozljedi mozga (B, D, F). Mjesta intraparenhimnog krvarenja označena su praznom strelicom. Degenerirani, piknotički neuroni označeni su glavama strelica, a ozlijeđeni, eozinofilni neuroni crnim strelicama. Mjesta perivaskularnog nakupljanja neutrofila označena su zvjezdicom, dok su intraparenhimno migrirani neutrofilii obilježeni znakom ljestva. Linije skala: 500 μ m (A, B); 200 μ m (C, D); 50 μ m (E, F).



Slika 7. Mikrofotografije hematoksilinom i eozinom obojanih preparata koronalnih sekcija hipokampusa štakora kontrolne skupine (A, C) i životinja podvrgnutih eksperimentalnoj traumatskoj ozljedi mozga (B, D). Prikazane su sljedeće regije hipokampusa: (A, B) CA2/3 (bregma -3,72) i (C, D) CA3 (bregma -4,80). Linije skale: 500 μm (A, B); 200 μm (C, D). Mjesta intraparenhimnog krvarenja označena su praznim strelicama. Degenerirani, piknotički neuroni označeni su glavama strelica, a ozlijeđeni, eozinofilni neuroni crnim strelicama.



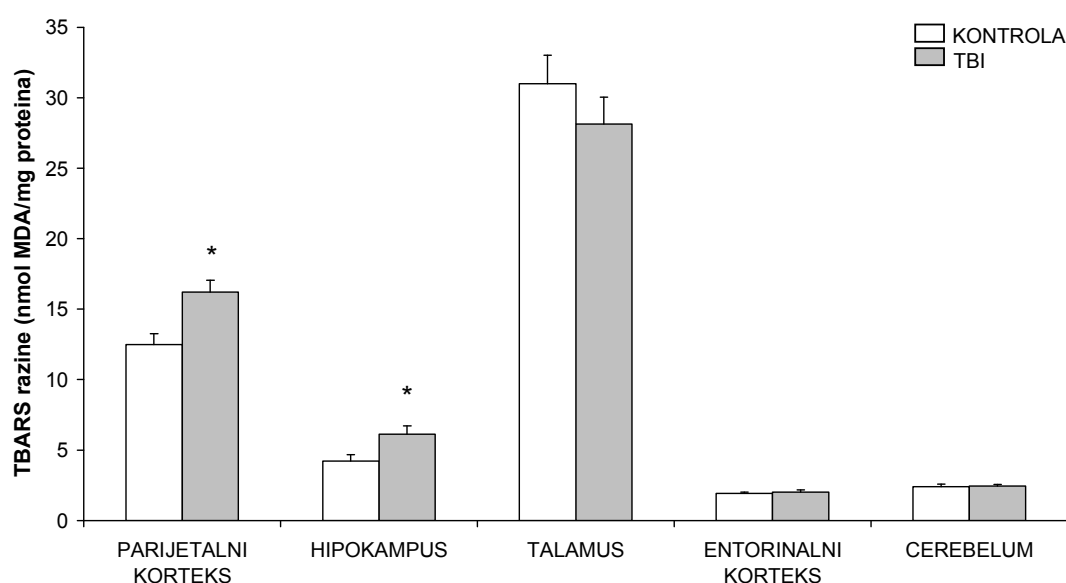
Slika 8. Mikrofotografije hematoksilinom i eozinom obojanih preparata koronalnih sekcija dorzalnog talamusa štakora kontrolne skupine (A) i životinje podvrgnute eksperimentalnoj traumatskoj ozljedi mozga (B). Strelice označavaju eozinofilne, ozlijeđene neurone. Linija skale: 200 μm .



Slika 9. Mikrofotografije krezil violetom obojanih preparata koronalnih sekcija parijetalnog korteksa (A, B) i hipokampusa (C-F) štakora kontrolne skupine (A, C, E) i životinja podvrgnutih eksperimentalnoj traumatskoj ozljedi mozga (B, D, F). Linija skale: 200 μ m.

4.1.2. Oksidativno oštećenja lipida i proteina u različitim moždanim strukturama štakora nakon traumatske ozljede mozga

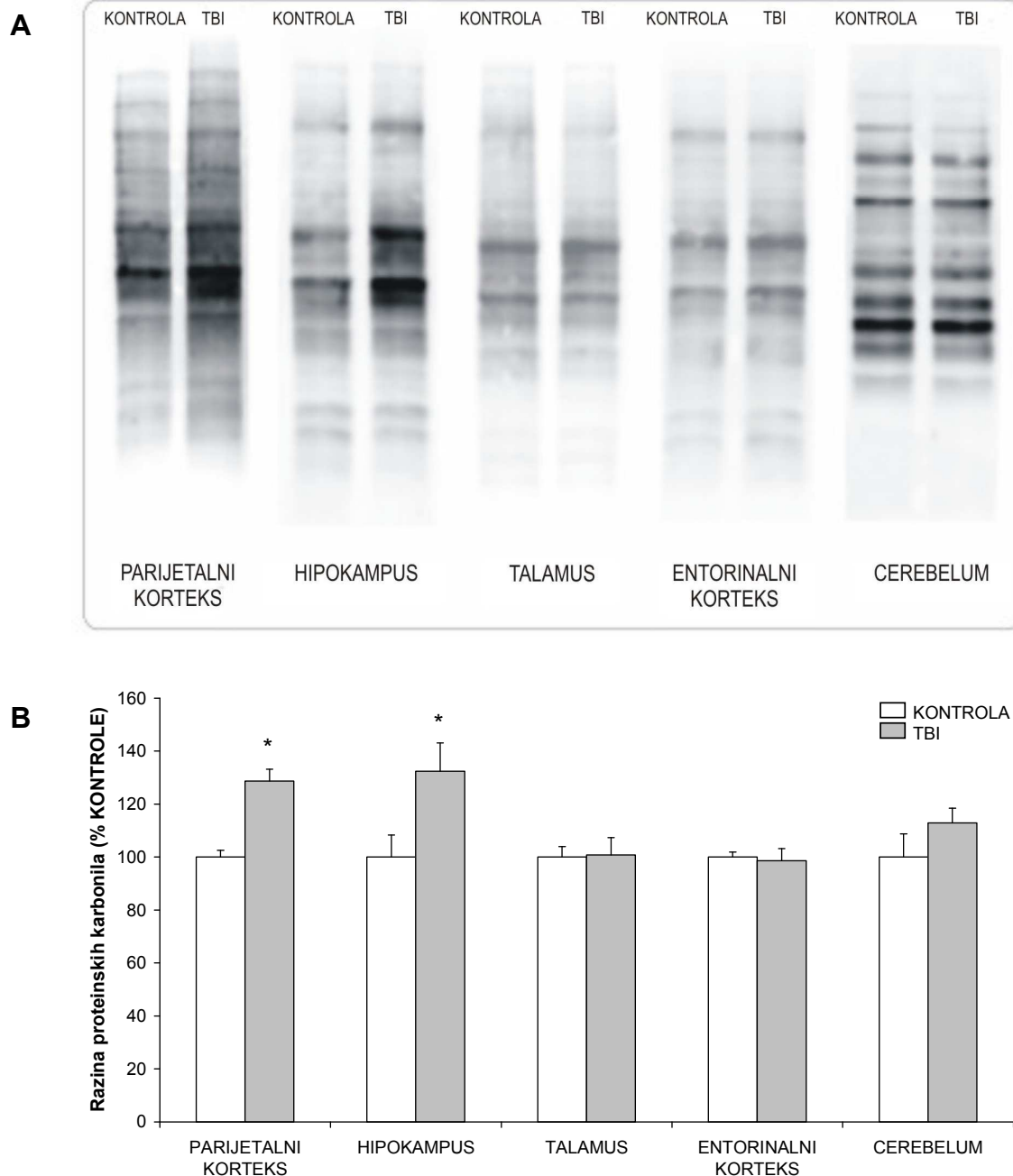
Razine TBARS određivane su u različitim ipsilateralnim strukturama mozga štakora s namjerom da se istraži postojanje oksidativnog oštećenja moždanih lipida u životinja podvrgnutih TBI (Slika 10.). Statistički značajan učinak LFP ozljede na moždane lipide pronađen je u parijetalnom korteksu [$t = -3,295$; $P = 0,004$] i hipokampusu [$t = -2,574$; $P = 0,019$].



Slika 10. Razine TBARS (nmol MDA/mg proteina) u različitim strukturama mozga štakora kontrolne skupine (KONTROLA) i životinja žrtvovanih 24 h nakon TBI (TBI). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SEM ($n = 8-10$). * $P < 0,05$; značajno različito od pripadajuće kontrolne skupine.

Razine TBARS bile su povišene za 30 % u parijetalnom korteksu, te za 46 % u hipokampusu, u usporedbi s vrijednostima TBARS (100 %) u odgovarajućim regijama lažno ozlijeđenih životinja kontrolne skupine. Razine TBARS u ipsilateralnom talamusu [$t = 1,021$; $P = 0,321$], entorinalnom korteksu [$t = -0,651$; $P = 0,523$] i cerebelumu [$t = -0,117$; $P = 0,908$] nisu bile značajno promijenjene u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrijednosti.

Oksidativno oštećenje moždanih proteina procjenjivano je pomoću Western blot analize DNPH-derivatiziranih karbonilnih skupina oksidiranih proteina (Slika 11.).



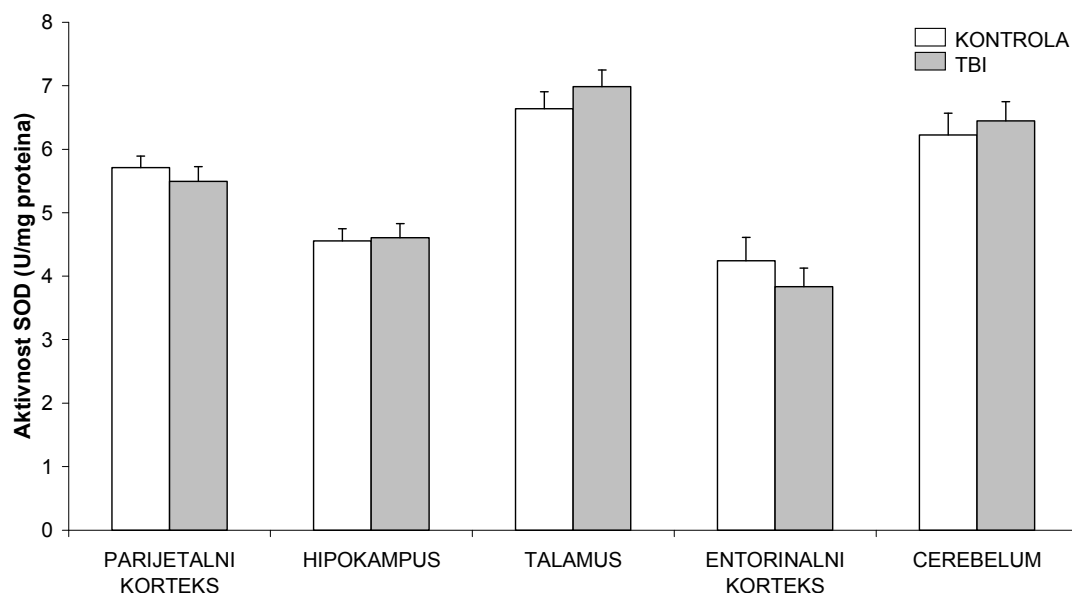
Slika 11. Učinak TBI na razine oksidiranih proteina u različitim strukturama mozga štakora. (A) Reprezentativni OxyBlot™ bendovi u štakora kontrolne skupine (KONTROLA) i životinja žrtvovanih 24 h nakon TBI (TBI). (B) Razine proteinskih karbonila (% kontrole) u štakora kontrolne skupine (KONTROLA) i životinja žrtvovanih 24 h nakon TBI (TBI). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SEM ($n = 4-6$). * $P < 0,05$; značajno različito od odnosne kontrolne skupine.

Reprezentativni primjeri Oxyblot™ kitom analiziranih uzoraka ipsilateralnih regija mozga životinja kontrolne skupine i štakora s TBI prikazani su na slici 11.A. Rezultati denzitometrijskih mjerenja analiziranih uzoraka prikazani su na slici 11.B. Statistička analiza

Student t-testom pokazala je značajan učinak traume mozga na razine oksidiranih proteina u parijetalnom korteksu [$t = -5,521$; $P < 0,001$] i hipokampusu [$t = -2,393$; $P = 0,044$]. Razine oksidiranih proteina u štakora s LFP ozljedom bile su povećane za 29 % u parijetalnom korteksu, a za 32 % u hipokampusu u odnosu na razine zabilježene u životinja kontrolne skupine (100 %). U drugim istraživanim regijama mozga nije otkriven značajan učinak traume mozga na razine oksidiranih proteina (talamus: [$t = -0,105$; $P = 0,919$], entorinalni korteks [$t = 0,234$; $P = 0,821$] i cerebelum: [$t = -1,252$; $P = 0,239$]).

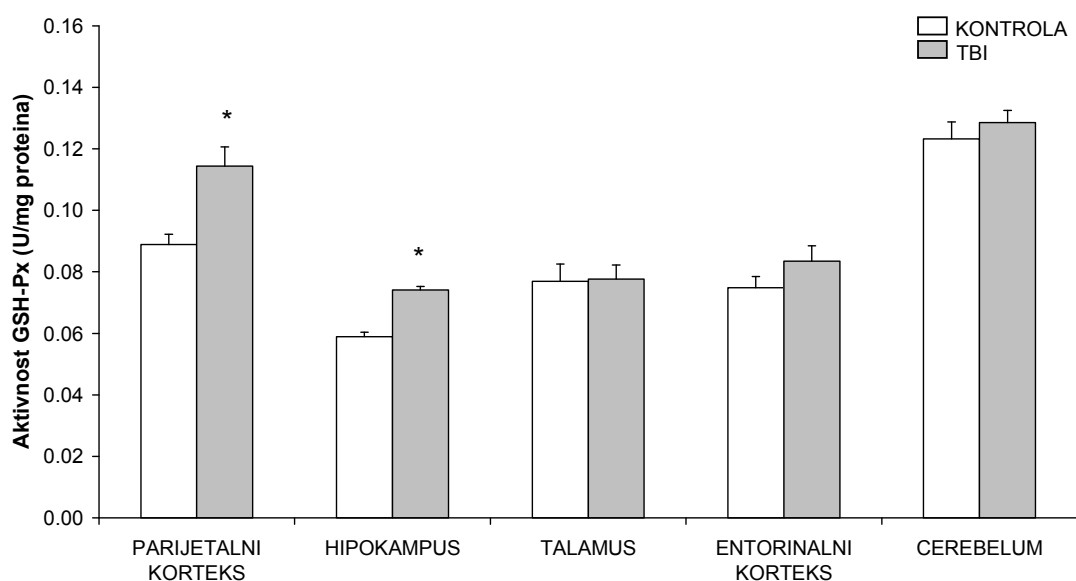
4.1.3. Aktivnosti antioksidativnih enzima u različitim moždanim strukturama štakora nakon traumatske ozljede mozga

Slika 12. prikazuje aktivnosti SOD u različitim regijama mozga životinja s LFP ozljedom, te u štakora kontrolne skupine. Statistička analiza Student t-testom nije pokazala značajan učinak TBI na aktivnosti navedenog antioksidativnog enzima niti u jednoj testiranoj strukturi mozga.



Slika 12. Aktivnosti SOD (U/mg proteina) u različitim strukturama mozga štakora kontrolne skupine (KONTROLA) i životinja žrtvovanih 24 h nakon TBI (TBI). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SEM ($n = 8-10$).

Na slici 13. prikazane su razine aktivnosti GSH-Px u testiranim moždanim strukturama u životinja s LFP ozljedom, kao i u lažno operiranih životinja kontrolne skupine. Aktivnost GSH-Px u ipsilateralnom parijetalnom korteksu [$t = -3,589$; $P = 0,002$] i hipokampusu [$t = -8,074$; $P < 0,001$] životinja s LFP ozljedom bile su značajno više u odnosu na vrijednosti zabilježene u odgovarajućim strukturama životinja kontrolne skupine. Aktivnost GSH-Px u ipsilateralnom parijetalnom korteksu bila je viša za 29 %, a u hipokampusu za 26 % u odnosu na vrijednosti (100 %) kontrolne skupine. U ostalim strukturama mozga nisu zabilježene statistički značajne razlike između razina aktivnosti ovog enzima zabilježenih u ozljeđenih životinja i u štakora kontrolne skupine (talamus [$t = -0,001$; $P = 0,999$], entorinalni korteks [$t = -1,415$; $P = 0,179$] i cerebelum [$t = -0,776$; $P = 0,448$]).

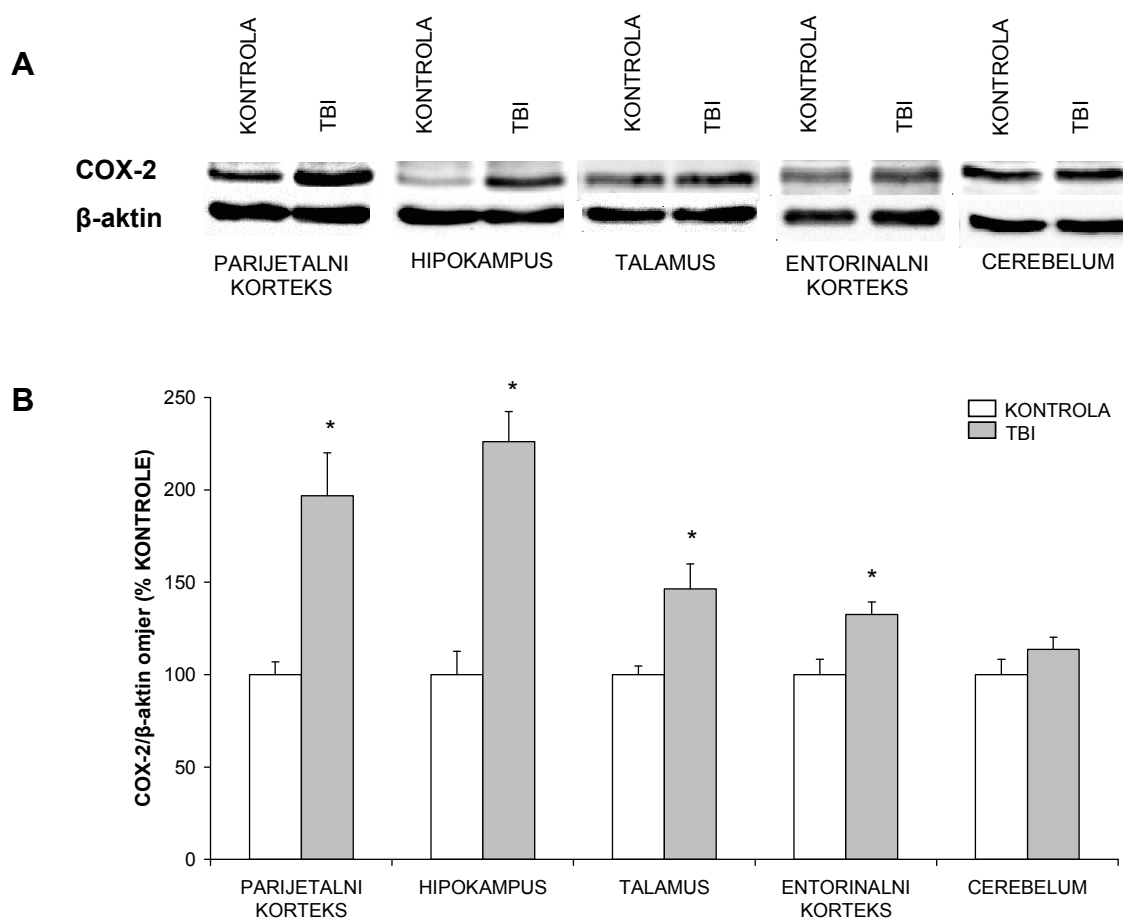


Slika 13. Aktivnosti GSH-Px (U/mg proteina) u različitim strukturama mozga štakora kontrolne skupine (KONTROLA) i životinja žrtvovanih 24 h nakon TBI (TBI). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SEM ($n = 8-10$). * $P < 0,05$; značajno različito od pripadajuće kontrolne skupine.

4.1.4. Razine ekspresija proteina od interesa u različitim moždanim strukturama štakora nakon traumatske ozljede mozga

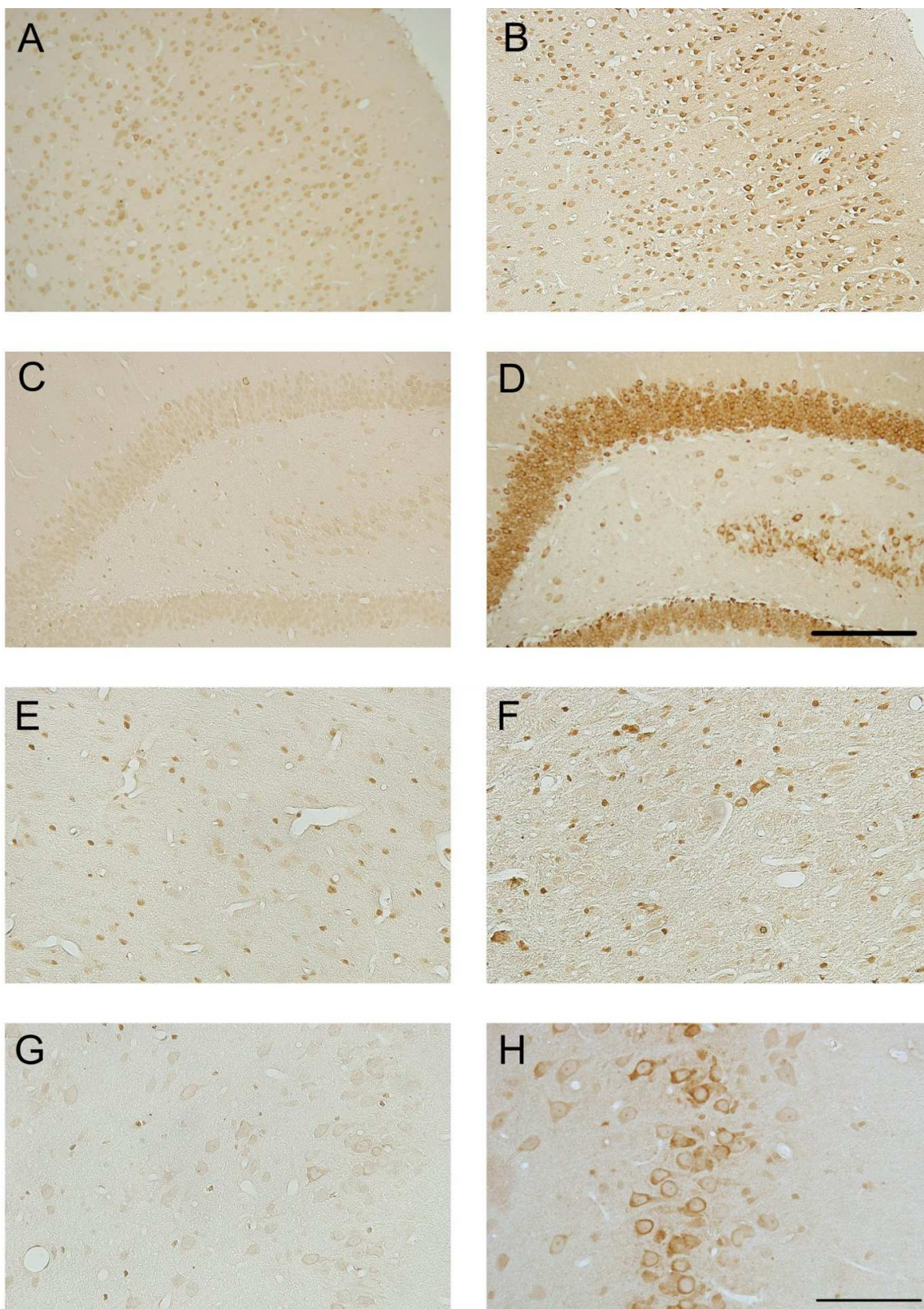
Slika 14. prikazuje reprezentativne blotove i pripadajuće denzitometrijske analize razina ekspresija COX-2 u različitim regijama mozga štakora kontrolne skupine i štakora s

TBI. Statističke analize pokazale su da je, osim u cerebelumu [$t = -1,294$; $P = 0,232$], prisutan značajan utjecaj traume na ekspresiju ovog enzima u istraživanim regijama mozga. Ekspresija COX-2 bila je povećana za 97 % u parijetalnom korteksu [$t = 3,243$; $P = 0,012$], 126 % u hipokampusu [$t = 5,905$; $P < 0,001$], 46 % u talamusu [$t = 2,799$; $P = 0,023$] i za 33 % u entorinalnom korteksu [$t = 3,043$; $P = 0,016$].



Slika 14. Utjecaj TBI na ekspresije COX-2 u različitim strukturama mozga štakora. (A) Reprezentativni uzorci blotova štakora kontrolne skupine (KONTROLA) i životinja žrtvovanih 24 h nakon TBI (TBI). (B) Denzitometrijske analize blotova COX-2 (COX-2/β-aktin omjer). Razine ekspresije COX-2 izražene su kao postotak srednje vrijednosti pripadajuće kontrolne skupine $\pm$ SEM ($n = 5$). * $P < 0,05$; značajno različito od pripadajuće kontrolne skupine.

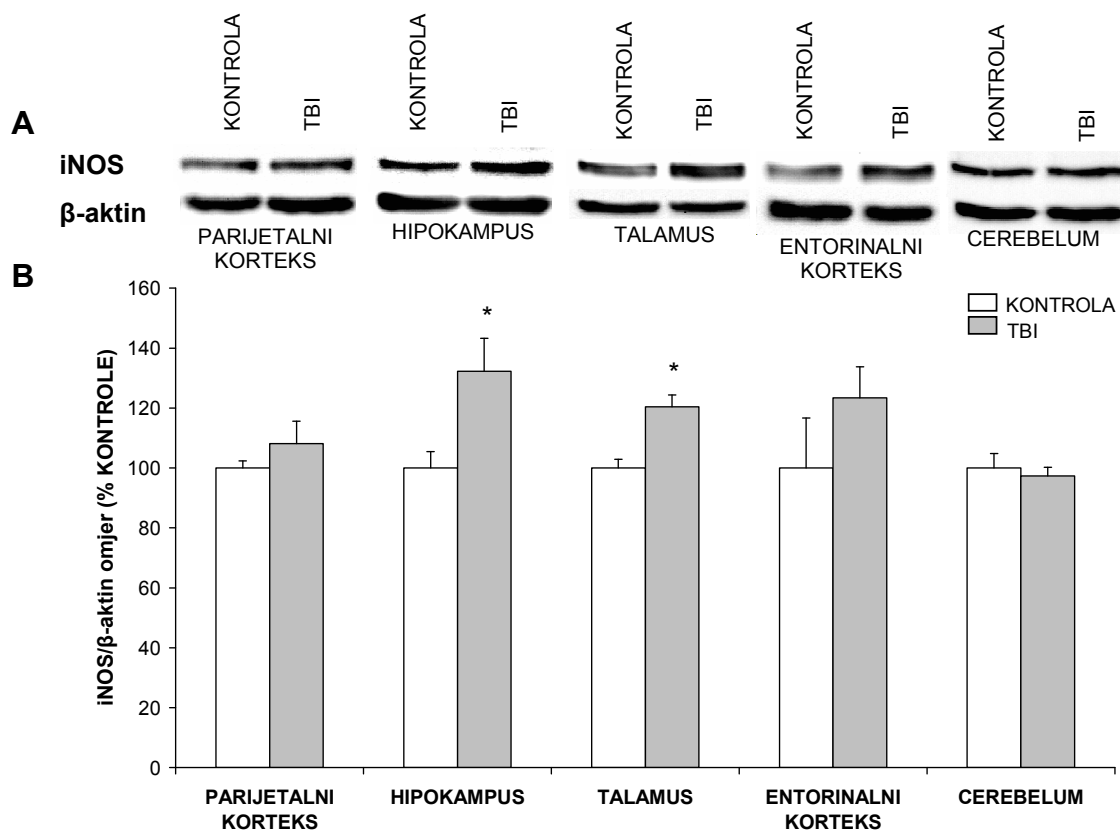
Imunohistološkom metodom analiziran je morfološki obrazac ekspresije COX-2 u kontrolnih životinja i u štakora podvrgnutih eksperimentalnoj TBI (Slika 15.). U mozgovima lažno operiranih štakora opažaju se imunoreaktivne stanice, bilateralno u površnim i srednjim slojevima korteksa, te u piramidalnom i granularnom staničnom sloju hipokampusu. Najveći broj detektiranih stanica morfološki odgovara neuronima (velike stanice, velike jezgre, vidljiva jezgrica, relativno oskudna citoplazma), ali se zamjećuje i određen broj COX-2 pozitivnih manjih stanica prisutnih u moždanom parenhimu, ali i u stijenkama krvnih žila i kapilara. U životinja podvrgnutih LFP ozljedi značajno je snažnije COX-2 imunobojanje u različitim moždanim strukturama u odnosu na štakore kontrolne skupine. U ozlijeđenih životinja intenzivnije bojanje citoplazmi prije svega neurona, ali i potpornih stanica opaža se u ipsilateralnom moždanom korteksu i bilateralno u hipokampusu. COX-2 pozitivne stanice detektiraju se u ozlijeđenom parijetalnom korteksu, ali i u susjednom korteksu koji nije primarno zahvaćen traumatskom ozljedom. Mnoštvo COX-2 imunoreaktivnih stanica opaženih u ozlijeđenom korteksu morfološki je promijenjeno, na način da neke pokazuju znakove degeneracije (skvrčena tijela neurona, trokutastog oblika, bez jasne citoplazme), a neke djeluju piknotički. U ipsilateralnim hipokampusima ozlijeđenih životinja izrazito intenzivno se bojaju neuroni CA2 i CA3 regije, te hilusa i granularnog sloja stanica dentatnog girusa. Neuroni pozitivni na COX-2 zamjećuju se i u peririnalnom području, kao i u jezgrama amigdaloidne strukture.



Slika 15. COX-2 imunoreaktivnost u parijetalnom korteksu (A, B), hipokampusu (C, D), talamusu (E, F), te entorinalnom korteksu (G, H) životinja kontrolne skupine (A, C, E, G) i štakora podvrgnutih TBI (B, D, F, H). Linije skala: 200 μm (A-D); 50 μm (E-F).

Na slici 16.A prikazani su reprezentativni blotovi, a na slici 16.B denzitometrijske analize rezultata mjerenja razina ekspresija iNOS u različitim moždanim strukturama štakora kontrolne skupine i životinja s traumom mozga.

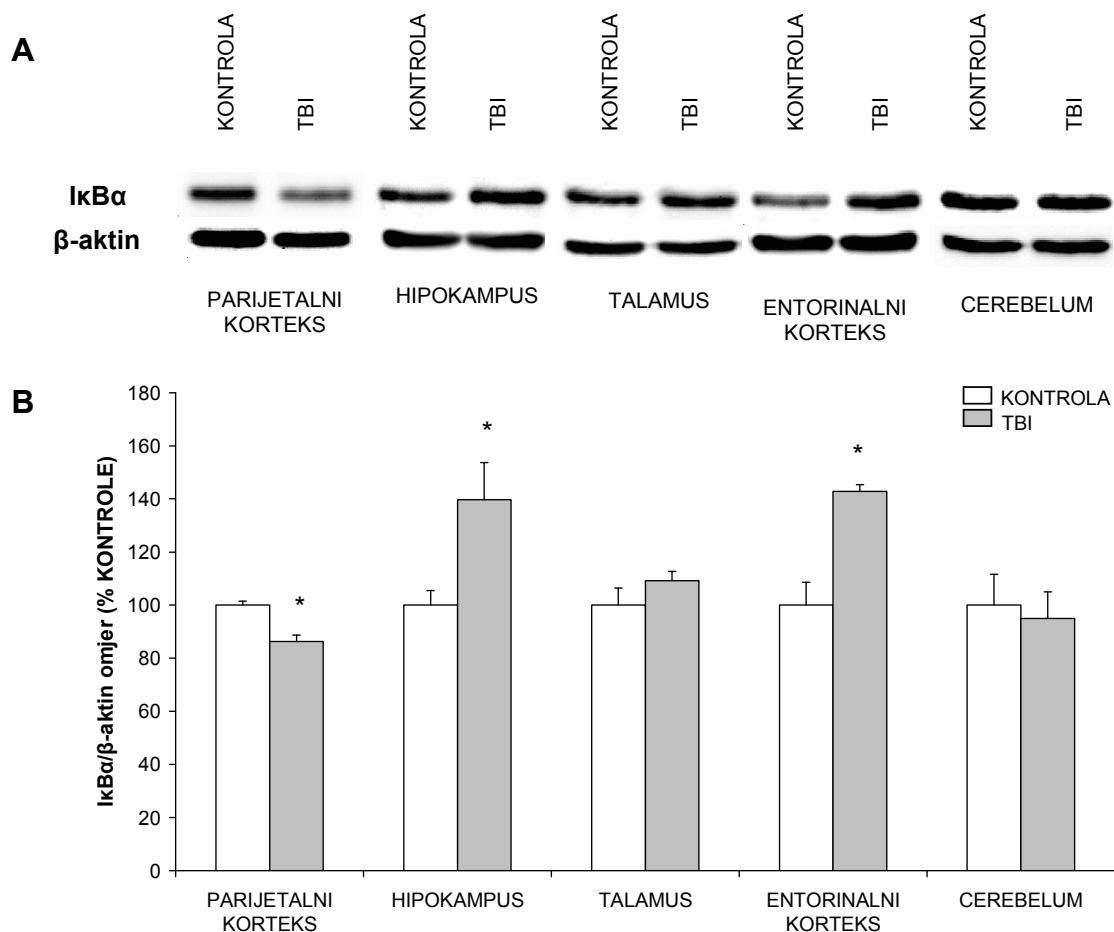
Umjerena LFP ozljeda mozga statistički je značajno povećala razine ekspresija iNOS u hipokampusu [$t = 2,449$; $P = 0,040$] i talamusu [$t = 4,071$; $P = 0,004$]. U ostalim istraživanim regijama mozga štakora (parijetalni korteks [$t = 0,981$; $P = 0,355$], entorinalni korteks [$t = 1,178$; $P = 0,273$], cerebelum [$t = 0,470$; $P = 0,651$]) nije bilo značajnog učinka traumatske ozljede na ekspresiju iNOS (Slika 16.).



Slika 16. Učinak TBI na ekspresiju iNOS u različitim strukturama mozga štakora. (A) Reprezentativni uzorci blotova štakora kontrolne skupine (KONTROLA) i životinja žrtvovanih 24 h nakon TBI (TBI). (B) Denzitometrijske analize blotova iNOS (iNOS/β-aktin omjer). Razine ekspresije iNOS izražene su kao postotak srednje vrijednosti pripadajuće kontrolne skupine $\pm$ SEM ($n = 5$). * $P < 0,05$; značajno različito od pripadajuće kontrolne skupine.

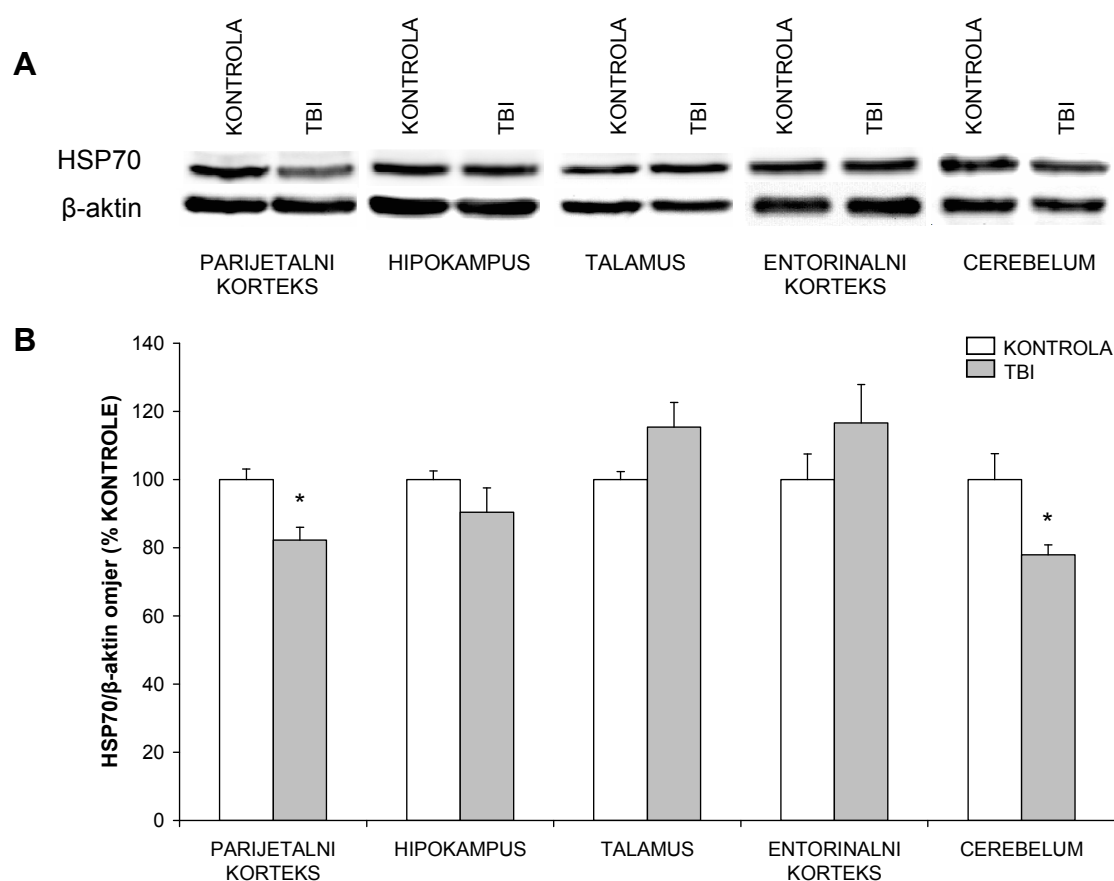
Promjene razina ekspresija I κ B α u različitim regijama mozga životinja kontrolne skupine i štakora podvrgnutih TBI prikazane su na slici 17. Prikazani su reprezentativni blotovi (Slika 17.A) i njihove denzitometrijske analize (Slika 17.B).

Statističke analize pokazale su značajan utjecaj traume na ekspresiju istraživanog proteina u parijetalnom korteksu [$t = 4,392$; $P = 0,002$], hipokampusu [$t = 2,408$; $P = 0,043$] i entorinalnom korteksu [$t = 3,711$; $P = 0,006$]. U talamusu [$t = 1,233$; $P = 0,252$] i cerebelumu [$t = 0,327$; $P = 0,752$] nije bilo značajnih razlika u razinama ekspresije I κ B α između lažno ozlijeđenih životinja kontrolne skupine i štakora s traumom mozga (Slika 17.).



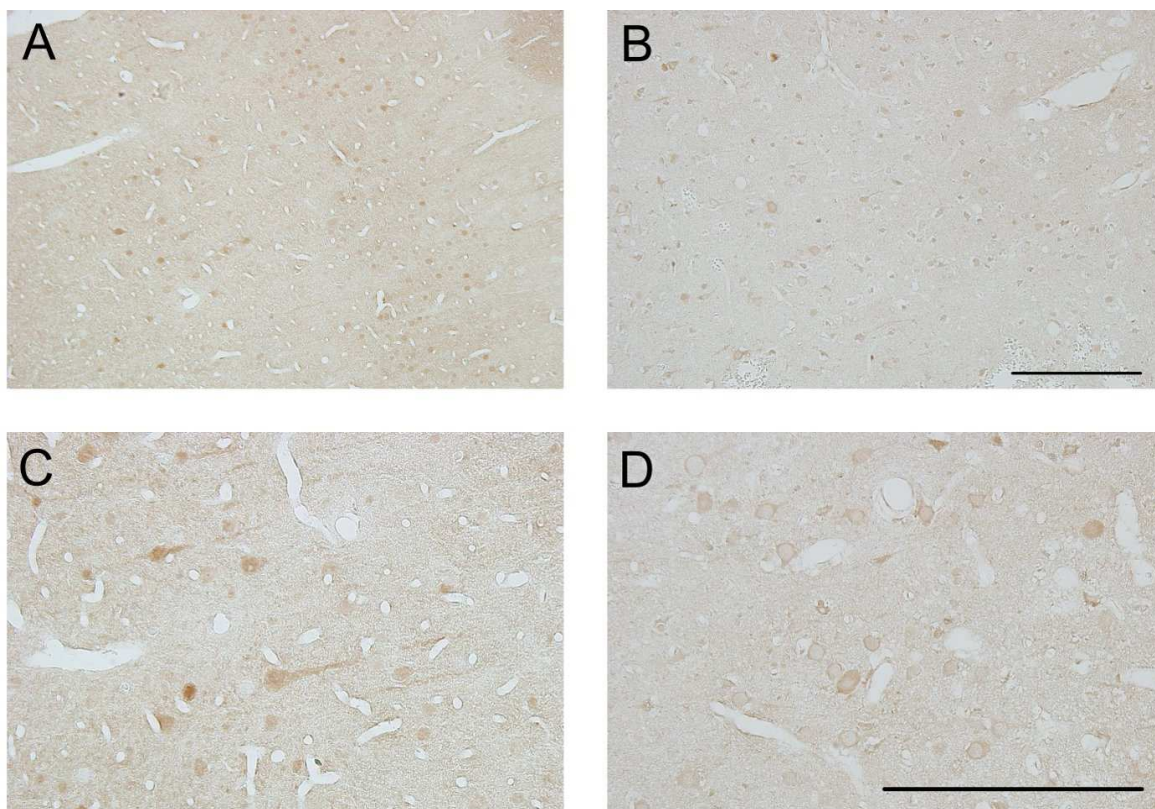
Slika 17. Učinak TBI na ekspresiju I κ B α u različitim strukturama mozga štakora. (A) Reprezentativni uzorci blotova štakora kontrolne skupine (KONTROLA) i životinja žrtvovanih 24 h nakon TBI (TBI). (B) Denzitometrijske analize blotova I κ B α (I κ B α / β -aktin omjer). Razine ekspresije I κ B α izražene su kao postotak srednje vrijednosti pripadajuće kontrolne skupine $\pm$ SEM ($n = 5$). * $P < 0,05$; značajno različito od pripadajuće kontrolne skupine.

Statističke analize pokazale su značajan učinak traume na ekspresije protektivnog proteina HSP70 u ipsilateralnim parijetalnom korteksu [$t = 3,611$; $P = 0,007$] i cerebelumu [$t = 2,432$; $P = 0,041$] ozlijeđenih životinja (Slika 18.). Ekspresija navedenog proteina bila je u parijetalnom korteksu za 18 %, a u cerebelumu za 22 % niža u odnosu na vrijednosti zabilježene u lažno operiranih životinja. U ostalim istraživanim regijama, hipokampusu [$t = 1,195$; $P = 0,266$], talamusu [$t = 1,869$; $P = 0,099$] i entorinalnom korteksu [$t = 1,216$; $P = 0,259$], sadržaj ovog proteina-molekulskog pratioca nije se statistički značajno mijenjao pod utjecajem traume mozga (Slika 18.B).



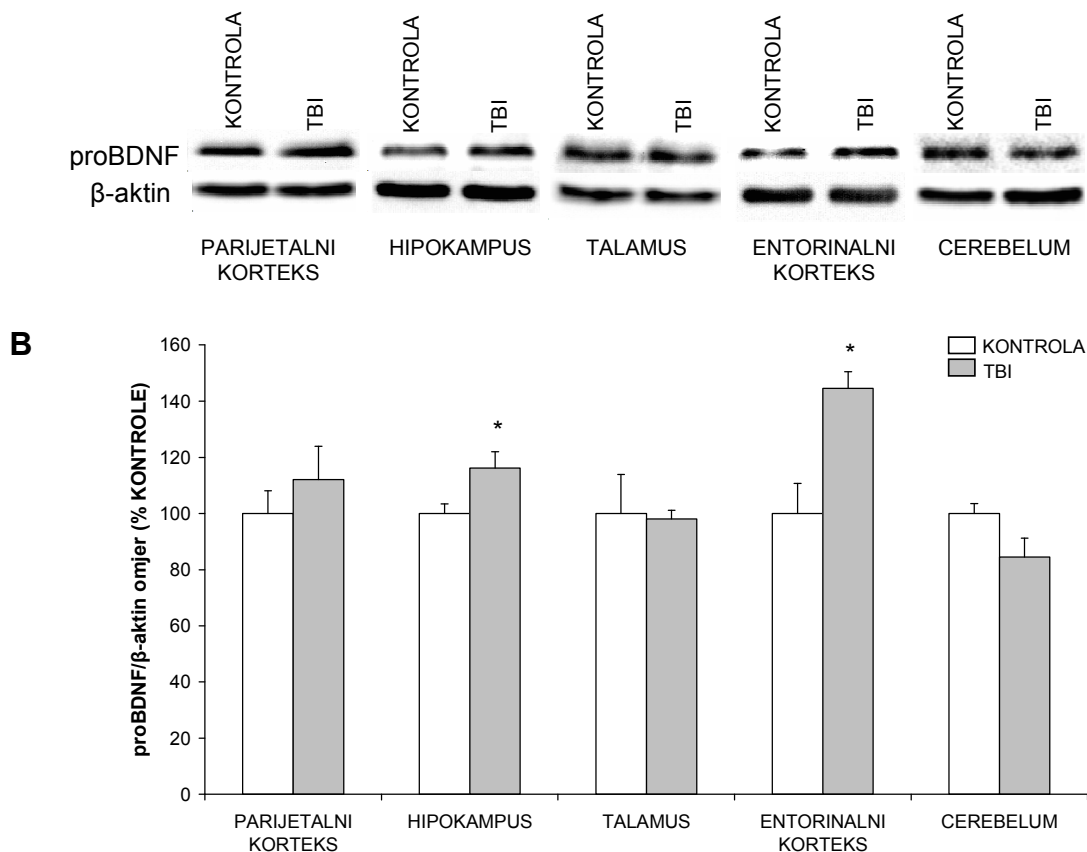
Slika 18. Učinak TBI na ekspresiju HSP70 u različitim strukturama mozga štakora. (A) Reprezentativni uzorci blotova štakora kontrolne skupine (KONTROLA) i životinja žrtvovanih 24 h nakon TBI (TBI). (B) Denzitometrijske analize blotova HSP70 (HSP70/β-aktin omjer). Razine ekspresije HSP70 izražene su kao postotak srednje vrijednosti pripadajuće kontrolne skupine ± SEM (n = 5). * $P < 0,05$; značajno različito od pripadajuće kontrolne skupine.

Nalaz snižene ekspresije HSP70 proteina u parijetalnom korteksu ozlijeđenih, u odnosu na životinja kontrolne skupine, potvrđen je i imunohistokemijskom analizom, koja je prikazana na slici 19.



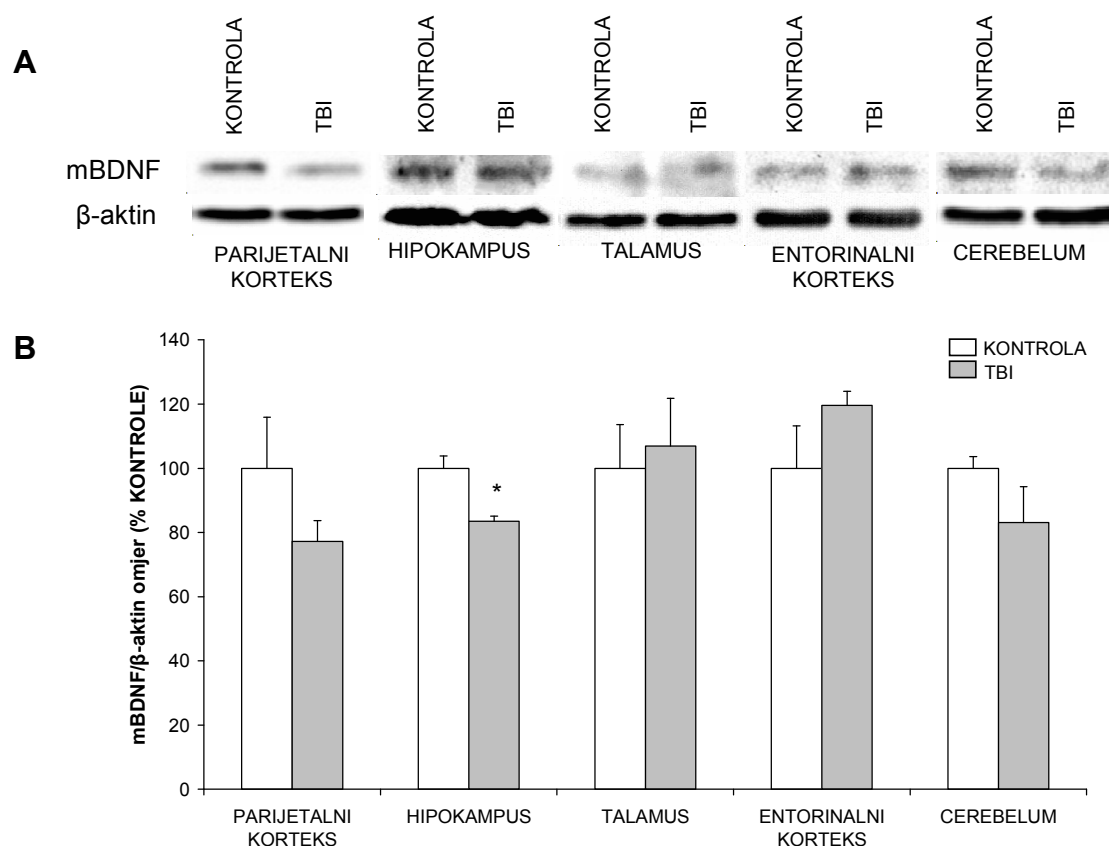
Slika 19. HSP70 imunoreaktivnost u parijetalnom korteksu životinja kontrolne skupine (A, C), te u štakora s TBI (B, D). Linija skale: 200 μm .

Ekspresije proBDNF u hipokampusu [$t = 2,315$; $P = 0,049$] i entorinalnom korteksu [$t = 3,357$; $P = 0,010$] statistički su se značajno razlikovale u odnosu na ekspresije detektirane u odgovarajućim regijama životinja kontrolne skupine (Slika 20.). U hipokampusu i entorinalnom korteksu zabilježene su veće količine navedenog proneurotrofina u životinja s TBI, i to za 16 % u hipokampusu, odnosno 45 % u entorinalnom korteksu (Slika 20.B). Pod utjecajem traume ekspresija proBDNF nije se značajno mijenjala u parijetalnom korteksu [$t = 0,840$; $P = 0,426$], talamusu [$t = 0,133$; $P = 0,897$] i cerebelumu [$t = 1,947$; $P = 0,087$].



Slika 20. Učinak TBI na ekspresiju proBDNF u različitim strukturama mozga štakora. (A) Reprezentativni uzorci blotova štakora kontrolne skupine (KONTROLA) i životinja žrtvovanih 24 h nakon TBI (TBI). (B) Denzitometrijske analize blotova proBDNF (proBDNF/β-aktin omjer). Razine ekspresije proBDNF izražene su kao postotak srednje vrijednosti pripadajuće kontrolne skupine ± SEM (n = 5). * $P < 0,05$; značajno različito od pripadajuće kontrolne skupine.

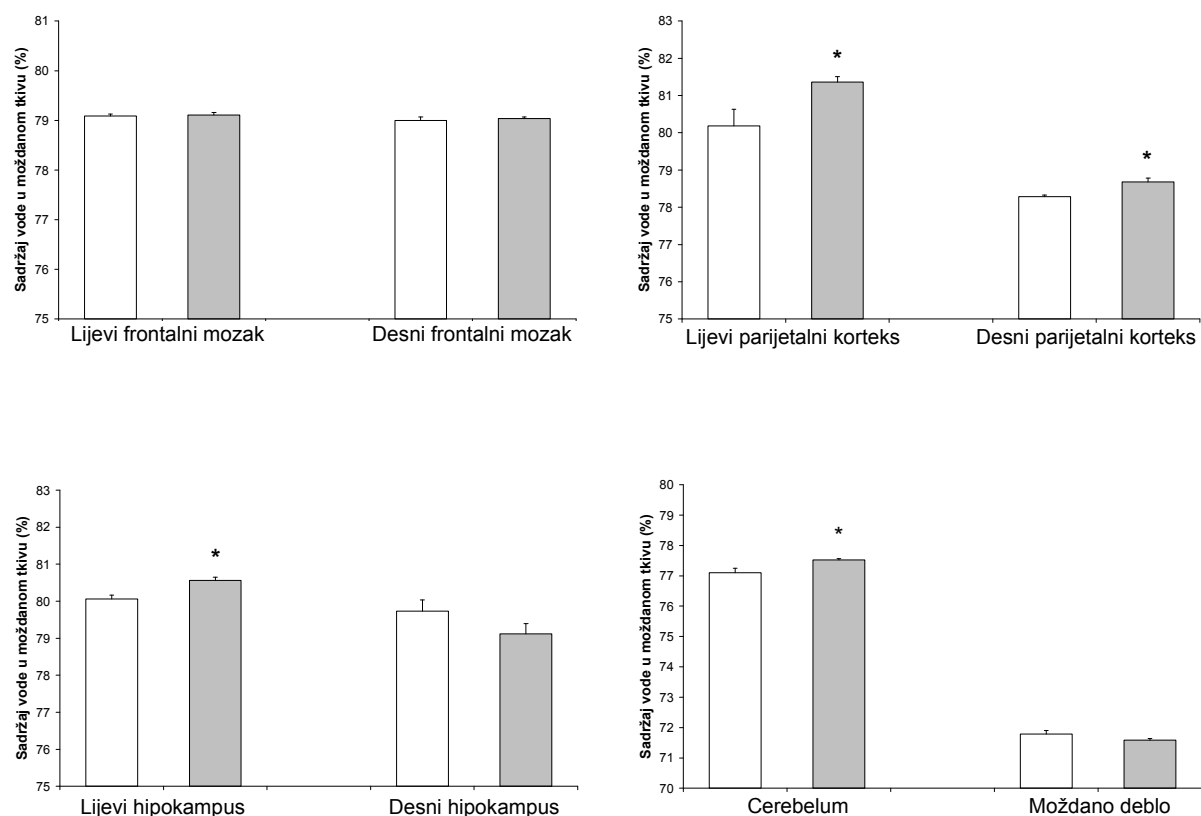
Slika 21. prikazuje reprezentativne blotove i odgovarajuće denzitometrijske analize ekspresija mBDNF u istraživanim moždanim strukturama životinja kontrolne skupine i štakora podvrgnutih TBI. Statističke analize su pokazale da je sadržaj ovog proteina statistički značajno niži u hipokampusu životinja s TBI [$t = 3,409$; $P = 0,009$]. U ostalim regijama mozga nisu zabilježene značajne razlike u ekspresijama ovog neurotrofina između traumatiziranih štakora i životinja kontrolne skupine (parijetalni korteks [$t = 1,268$; $P = 0,240$], talamus [$t = 0,341$; $P = 0,742$], entorinalni korteks [$t = 1,335$; $P = 0,219$], cerebelum [$t = 1,356$; $P = 0,212$]).



Slika 21. Učinak TBI na ekspresiju mBDNF u različitim strukturama mozga štakora. (A) Reprezentativni uzorci blotova štakora kontrolne skupine (KONTROLA) i životinja žrtvovanih 24 h nakon TBI (TBI). (B) Denzitometrijske analize blotova mBDNF (mBDNF/β-aktin omjer). Razine ekspresije mBDNF izražene su kao postotak srednje vrijednosti pripadajuće kontrolne skupine ± SEM (n = 5). * $P < 0,05$; značajno različito od pripadajuće kontrolne skupine.

4.1.5. Edem mozga u različitim moždanim strukturama štakora nakon traumatske ozljede mozga

Rezultati analize regionalnog sadržaja vode u različitim regijama mozga testiranih životinja prikazani su na slici 22. U usporedbi s lažno operiranim životinjama, štakori koji su bili podvrgnuti LFP ozljedi imali su značajan edem mozga u ipsilateralnom parijetalnom korteksu [$t = -2,504$, $P = 0,025$] i hipokampusu [$t = -3,745$, $P = 0,002$], potom kontralateralnom, desnom parijetalnom korteksu [$t = -3,407$, $P = 0,004$], te cerebelumu [$t = -2,809$, $P = 0,014$]. Postotni sadržaj vode u ipsilateralnom parijetalnom korteksu kontrolnih životinja bio je 80,18 %, a u ozlijeđenih 81,36 %, dok su izmjerene vrijednosti sadržaja vode za kontralateralni (desni) parijetalni korteks iznosile 78,29 % u kontrolnih, odnosno 78,68 %



Slika 22. Utjecaj TBI na sadržaj vode u različitim strukturama mozga životinja kontrolne skupine (□) i štakora s TBI (■). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SEM (n = 8).
* $P < 0,05$; značajno različito od pripadajuće kontrolne skupine.

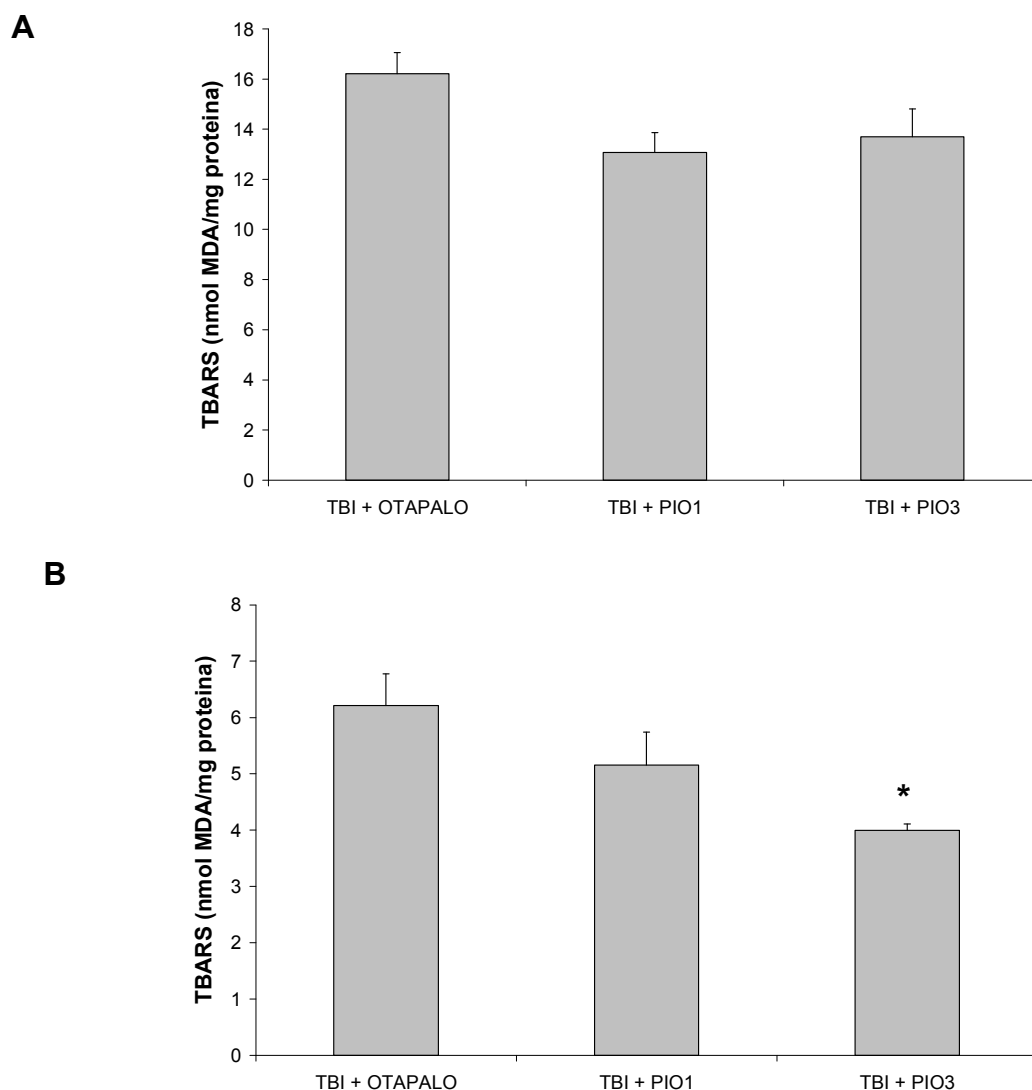
u ozlijeđenih životinja. Ipsilateralni hipokampusi životinja s lažnom ozljedom imali su 80,06 %, dok je u ozlijeđenih štakora u istoj strukturi mozga izmjereno 80,56 % sadržaja vode. U životinja kontrolne skupine izmjereno je 77,11 % vode u cerebelumima, a ista struktura u štakora podvrgnutih TBI imala je 77,53 % sadržaja vode. U ostalim istraživanim regijama i strukturama (ipsilateralni i kontralateralni frontalni mozak, kontralateralni hipokampus, moždano deblo) nije zabilježen značaj utjecaj traume na tkivni sadržaj vode (Slika 22.)

4.2. Utjecaj pioglitazona na pokazatelje moždanog oštećenja i endogene neuroprotekcije u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga

4.2.1. Utjecaj pioglitazona na oksidativno oštećenje lipida i proteina u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga

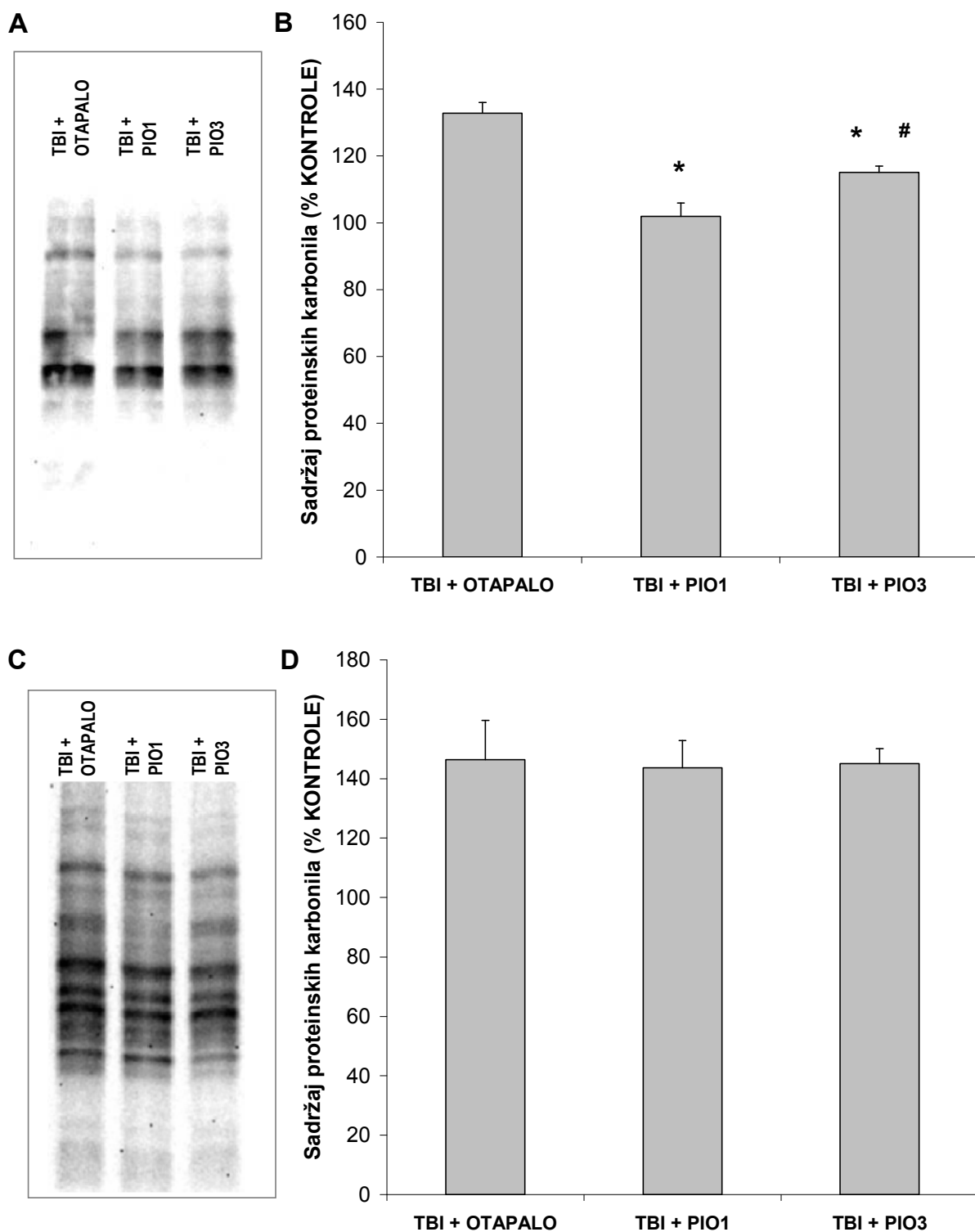
Slika 23. prikazuje TBARS razine u ipsilateralnom parijetalnom korteksu i hipokampusu životinja s lažnom TBI tretiranih otapalom, te životinja s TBI kojima je aplicirano otapalo, odnosno pioglitazon u dozi od 1 ili 3 mg/kg. Analiza varijanci nije pokazala statistički značajnu razliku u razinama oksidativno promijenjenih moždanih lipida u parijetalnom korteksu [$F(2,27) = 3,235$; $P = 0,055$] između istraživanih eksperimentalnih skupina, za razliku od hipokampusa [$F(2,27) = 5,503$; $P = 0,010$] u kojem je zabilježen značajan učinak tretmana na razinu oksidativnog oštećenja lipida. Duncanovim testom dalje su analizirane značajnosti razlika srednjih vrijednosti između pojedinih skupina životinja. U hipokampusu, ali ne i u parijetalnom korteksu, detektiran je značajan učinak tretmana pioglitazonom na razine TBARS u ozlijeđenih životinja. Naime, sadržaj oksidiranih lipida u parijetalnom korteksu ozlijeđenih životinja, kojima je injiciran lijek u dozi 1 mg/kg, bio je manji u odnosu na onaj izmjeran u ozlijeđenih, otapalom tretiranih štakora, no, nije dosegnuta razina statističke značajnosti ($P = 0,055$). Suprotno navedenom, u hipokampusu je učinkovita bila viša doza pioglitazona, te je u ovoj regiji mozga zabilježena statistički značajno manja razina oksidativno oštećenih moždanih lipida u ozlijeđenih životinja tretiranih pioglitazonom u dozi od 3 mg/kg u odnosu na hipokampalne razine TBARS izmjerene u ozlijeđenih štakora kojima je injicirano otapalo.

Slika 24. prikazuje reprezentativne blotove oksidiranih proteina parijetalnog korteksa i hipokampusa i pripadajuće denzitometrijske analize u štakora istraživanih eksperimentalnih skupina. Bilježi se statistički značajan učinak tretmana na razine oksidiranih proteina u



Slika 23. Učinak pioglitazona na razine TBARS (nmol MDA/mg proteina) u (A) parijetalnom korteksu i (B) hipokampusu 24 h nakon TBI. Štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO) ili pioglitazonom u dozi od 1 mg/kg (TBI + PIO1) ili 3 mg/kg (TBI + PIO3). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SEM ($n = 10$). * $P < 0,05$; značajno različito od skupine TBI + OTAPALO.

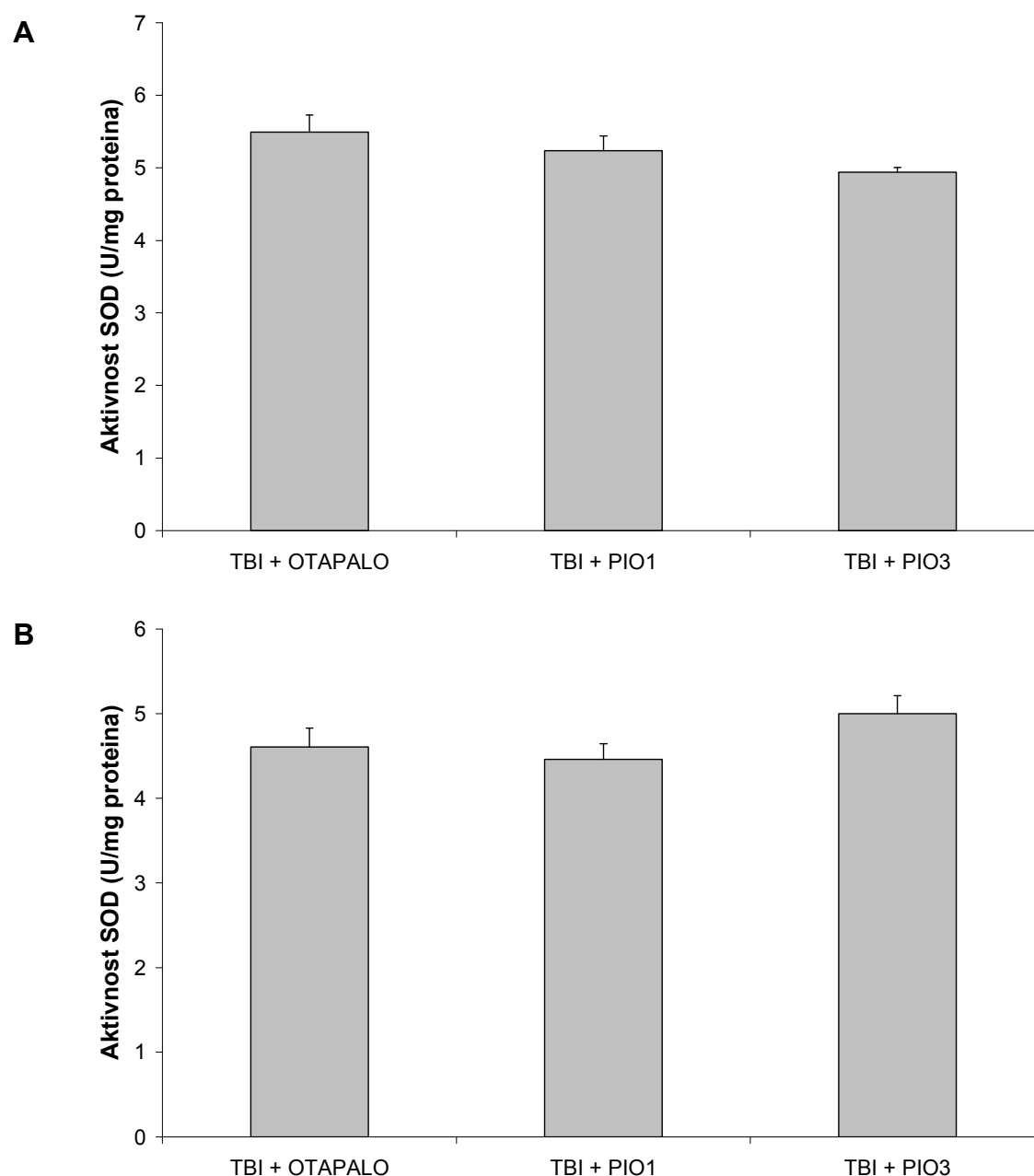
parijetalnom korteksu [$F(2,12) = 23,455$; $P < 0,001$], ali ne i u hipokampusu [$F(2,12) = 0,021$; $P = 0,980$]. Naime, tretman istraživanim PPAR γ agonistom značajno je smanjio razine oksidiranih kortikalnih proteina, pri čemu je učinkovitija bila niža doza pioglitazona (Slika 24.B). Razine se oksidativno oštećenih proteina u hipokampusima životinja podvrgnutih eksperimentalnoj TBI nisu mijenjale pod utjecajem tretmana pioglitazonom (Slika 24.D).



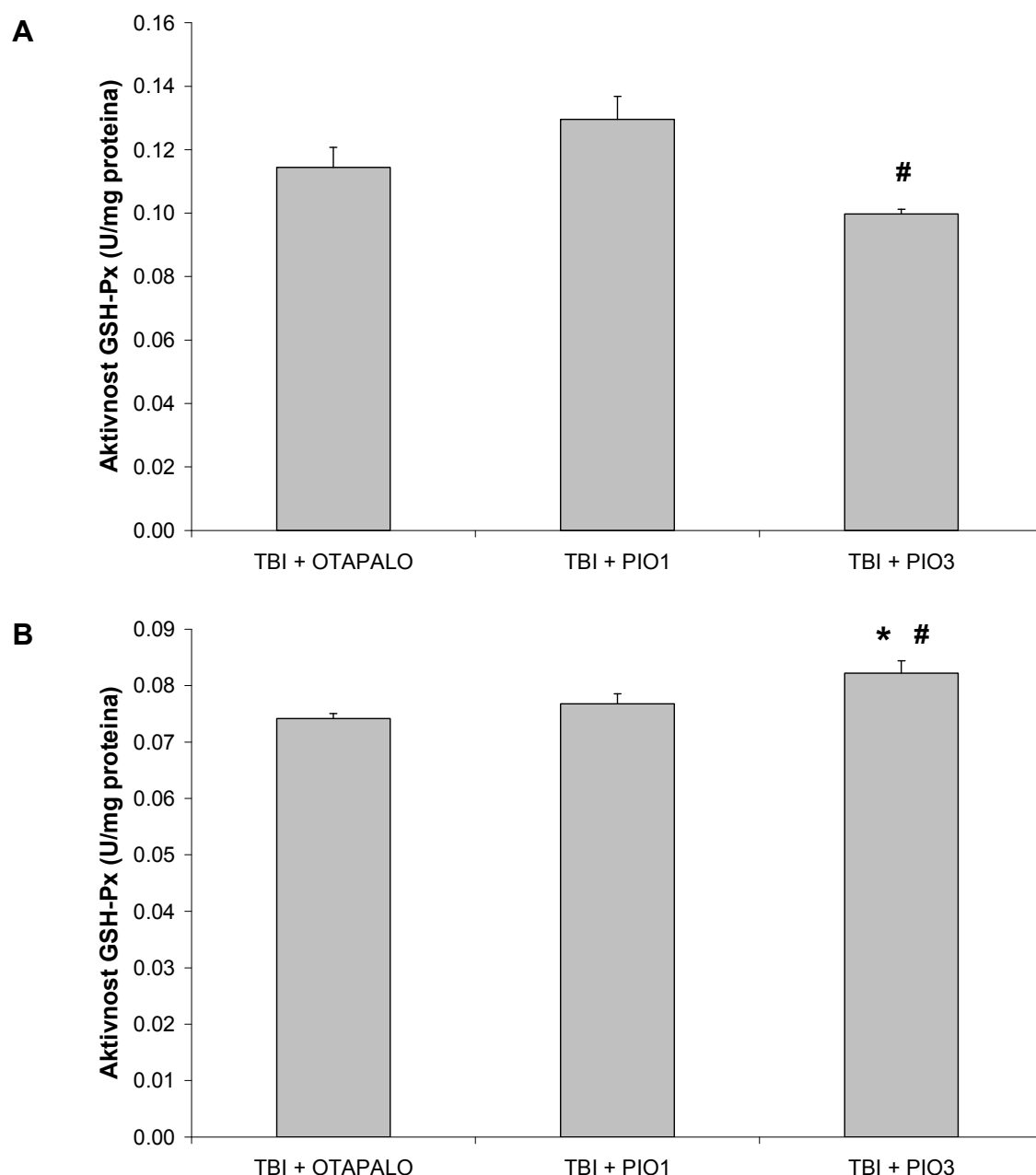
Slika 24. Učinak pioglitazona na razine oksidiranih proteina u parijetalnom korteksu (A, B) i hipokampusu (C, D) 24 h nakon TBI u štakora. Prikazani su reprezentativni Oxyblot™ bendovi (A, C) i pripadajuće denzitometrijske analize (B, D). Štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO) ili pioglitazonom u dozi od 1 mg/kg (TBI + PIO1) ili 3 mg/kg (TBI + PIO3). Vrijednosti izražene kao % kontrole. Stupci predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SEM (n = 5). * $P < 0,05$; značajno različito od TBI + OTAPALO skupine; # $P < 0,05$; značajno različito od TBI + PIO1 skupine.

4.2.2. Utjecaj pioglitazona na aktivnosti antioksidativnih enzima u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga

Analiza varijanci nije pokazala značajan učinak primjene pioglitazona na aktivnosti SOD u parijetalnom korteksu [$F(2,27) = 2,322$; $P = 0,117$], niti u hipokampusu [$F(2,27) = 1,815$; $P = 0,182$] eksperimentalnih životinja (Slika 25.).



Slika 25. Učinak pioglitazona na aktivnosti SOD (U/mg proteina) u parijetalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) štakora 24 h nakon TBI. Štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO) ili pioglitazonom u dozi od 1 mg/kg (TBI + PIO1) ili 3 mg/kg (TBI + PIO3). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SEM ($n = 10$).



Slika 26. Učinak pioglitazona na aktivnosti GSH-Px (U/mg proteina) u parijetalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) štakora 24 h nakon TBI. Kontrolna skupina (KONTROLA); štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO) ili pioglitazonom u dozi od 1 mg/kg (TBI + PIO1) ili 3 mg/kg (TBI + PIO3). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SEM ($n = 10$). * $P < 0,05$; značajno različito od TBI + OTAPALO skupine; [#] $P < 0,05$; značajno različito od TBI + PIO1 skupine.

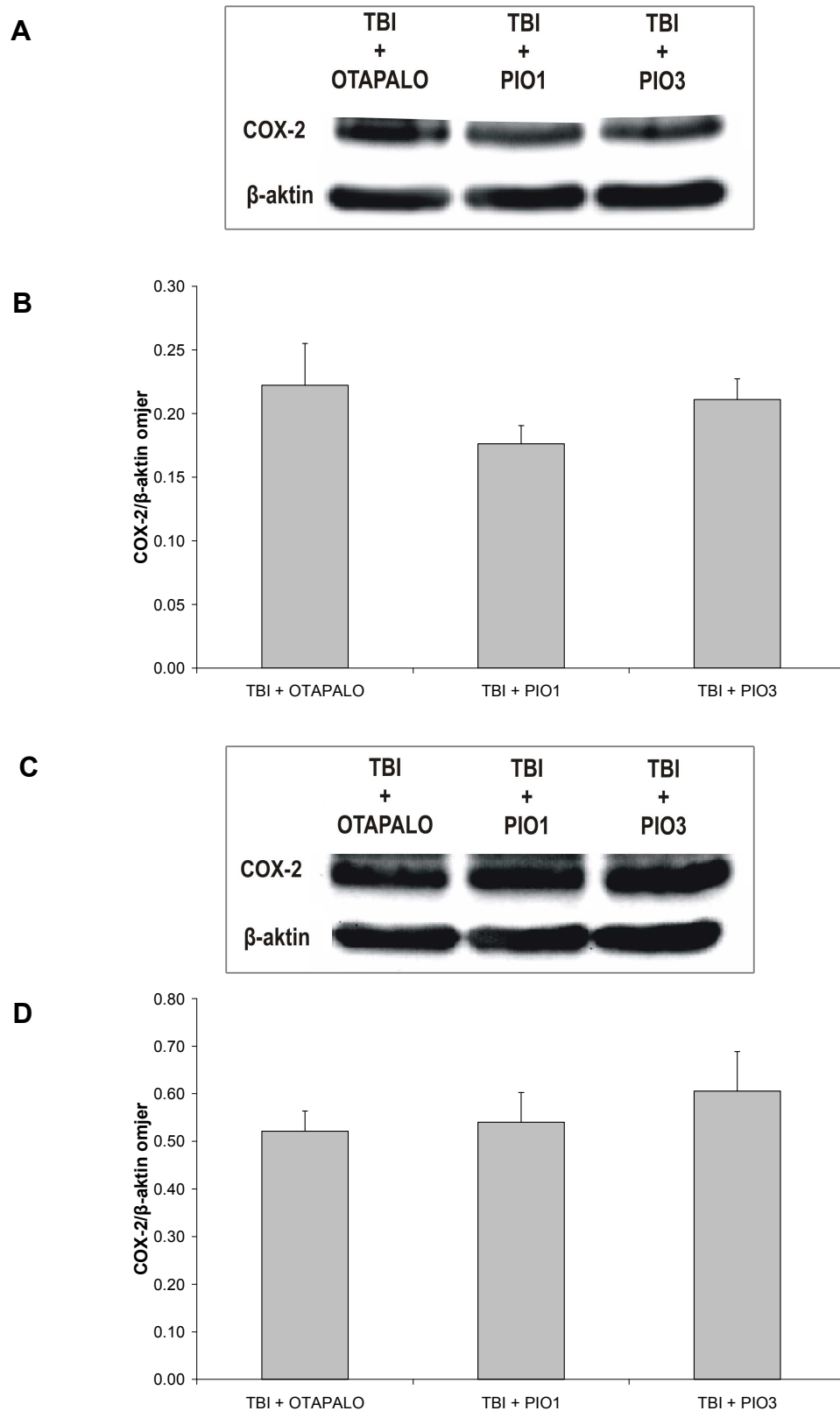
Aktivnosti drugog istraživanog antioksidativnog enzima, GSH-Px, u parijetalnom korteksu [$F(2,27) = 7,037$; $P < 0,001$] i hipokampusu [$F(2,27) = 5,731$; $P = 0,008$] životinja istraživanih eksperimentalnih skupina značajno su se razlikovale (Slika 26.). U parijetalnom

korteksu, primjena pioglitazona u dozi od 3 mg/kg uzrokovala je smanjenje aktivnosti istraživnog antioksidativnog enzima u odnosu na vrijednosti zabilježene u ozlijeđenih štakora tretiranih s 1 mg/kg pioglitazona (Slika 26.A). U hipokampusu, pioglitazon primijenjen u dozi od 3 mg/kg značajno je povisio razinu aktivnosti GSH-Px u odnosu na rezultate izmjerene u životinja podvrgnutih TBI, a kojima je bilo injicirano otapalo, odnosno pioglitazon u nižoj dozi (Slika 26.B).

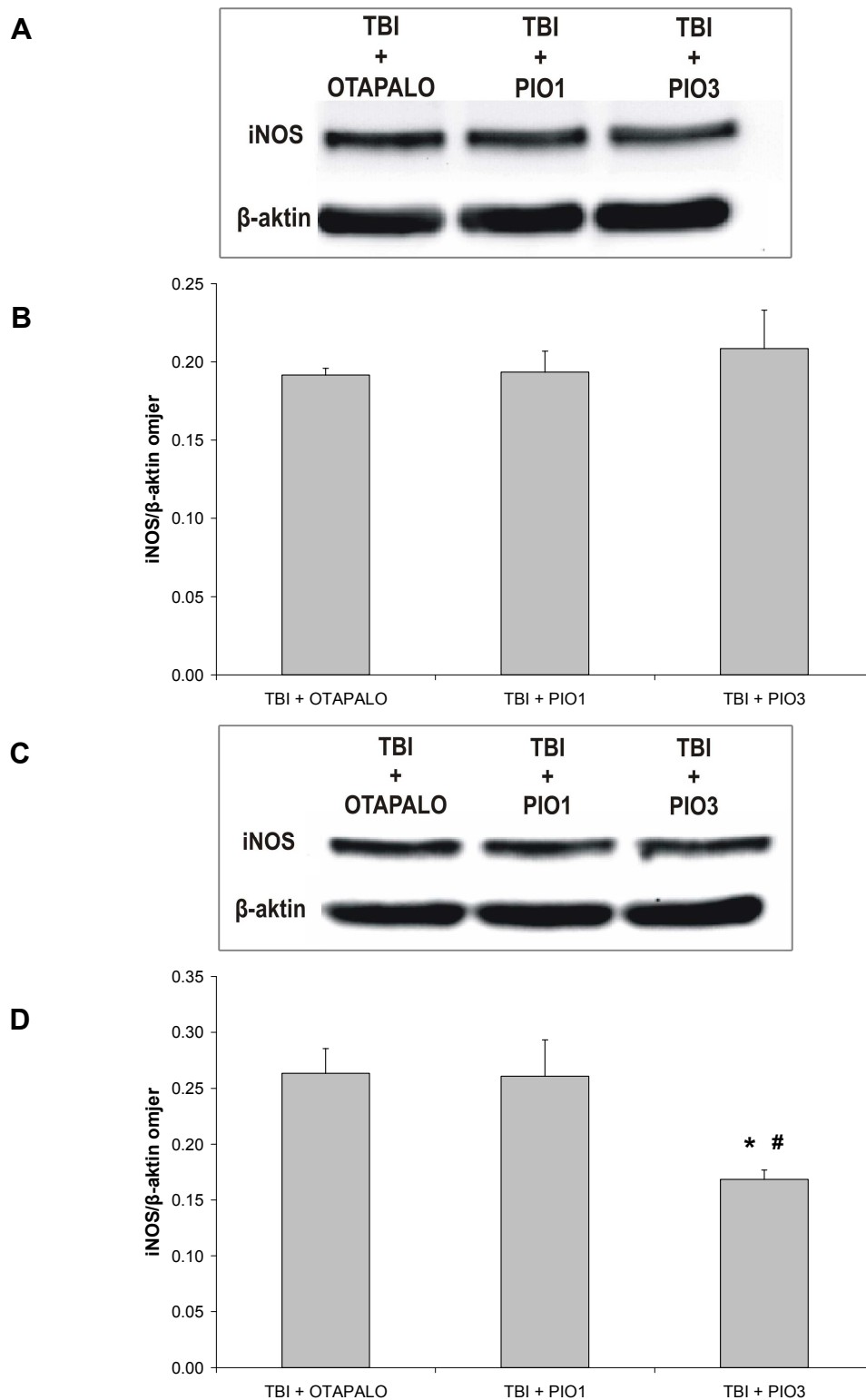
4.2.3. Utjecaj pioglitazona na razine ekspresija proteina od interesa u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga

Rezultati analize utjecaja primjene pioglitazona na ekspresije COX-2 u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora podvrgnutih eksperimentalnoj TBI prikazani su na slici 27. Statistički značajan utjecaj tretmana na Western blotom određivane razine ekspresija COX-2 nije zabilježen je istraživanim regijama mozga (parijetalni korteks [$F(2,12) = 1,107$; $P = 0,362$], hipokampus [$F(2,12) = 0,473$; $P = 0,634$]) (Slika 27.B i D). Iz prikazanih rezultata razvidno je kako tretman pioglitazonom nije utjecao na sadržaj COX-2 proteina u istraživanim moždanim regijama.

Na slici 28. prikazani su reprezentativni blotovi i pripadajuće denzitometrijske analize ekspresije iNOS u parijetalnom korteksu i hipokampusu životinja istraživanih eksperimentalnih skupina. U parijetalnom korteksu ekspresija ovog proupalnog enzima nije se mijenjala pod utjecajem tretmana [$F(2,12) = 0,135$; $P = 0,875$] (Slika 28.B). Suprotno navedenom, sadržaj istraživnog proteina u hipokampusu ozlijeđenih životinja tretiranih pioglitazonom u dozi od 3 mg/kg bio je značajno niži u odnosu na razine ekspresije proteina u štakora s TBI, a tretiranih otapalom [$F(2,11) = 4,420$; $P = 0,039$]. Doza pioglitazona od 1 mg/kg nije utjecala na razinu iNOS u hipokampusu ozlijeđenih životinja (Slika 28.D).



Slika 27. Učinak pioglitazona na ekspresije COX-2 u parijetalnom korteksu (A, B) i hipokampusu (C, D) štakora 24 h nakon TBI. (A, C) Reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina. (B, D) Denzitometrijske analize blotova COX-2 (COX-2/β-aktin omjer). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SEM ($n = 5$). Štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO) ili pioglitazonom u dozi od 1 mg/kg (TBI + PIO1) ili 3 mg/kg (TBI + PIO3).



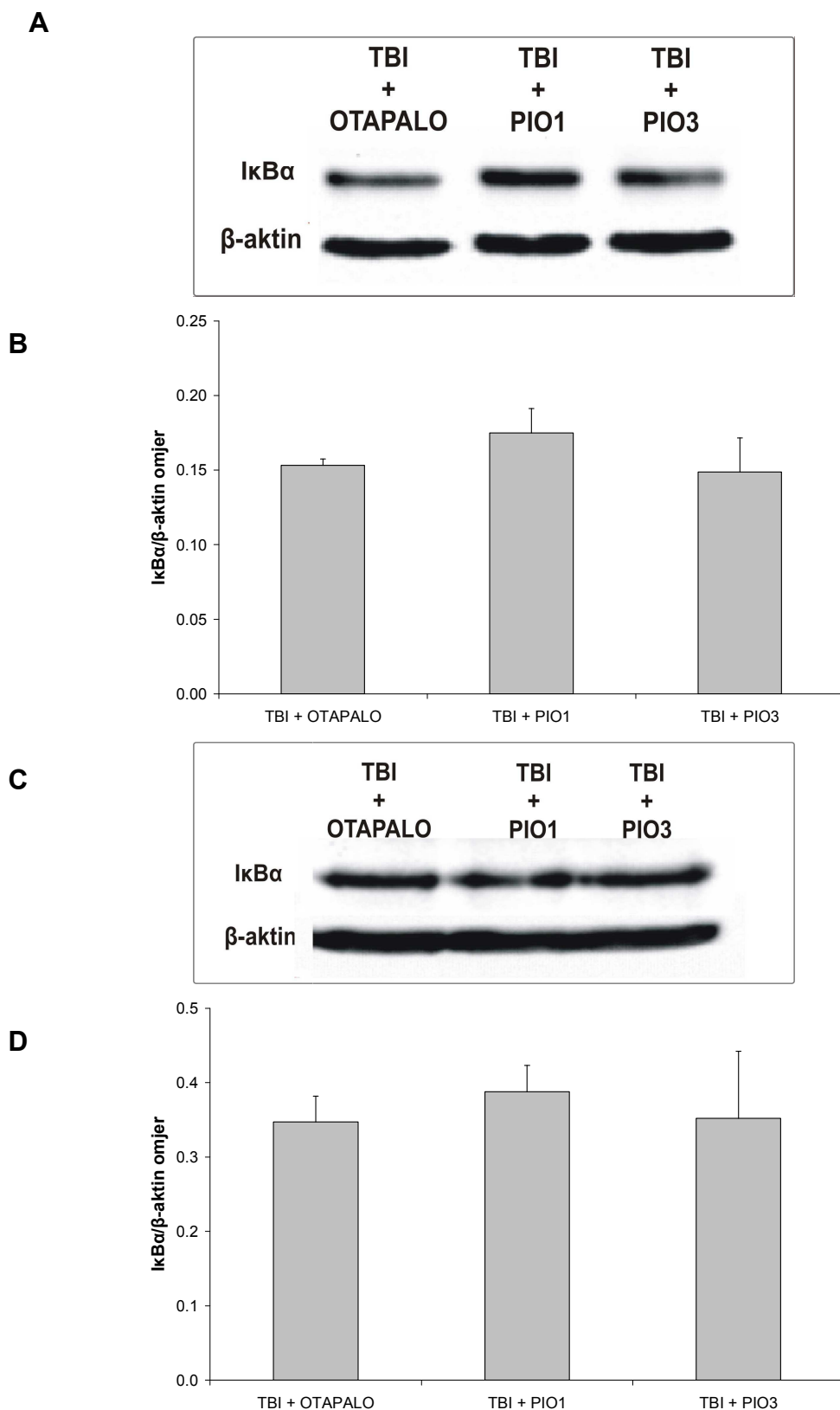
Slika 28. Učinak pioglitazona na ekspresije iNOS u parijetalnom korteksu (A, B) i hipokampusu (C, D) štakora 24 h nakon TBI. (A, C) Reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina. (B, D) Densitometrijske analize blotova iNOS (iNOS/β-aktin omjer). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SEM ($n = 4-5$). Štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO) ili pioglitazonom u dozi od 1 mg/kg (TBI + PIO1) ili 3 mg/kg (TBI + PIO3). * $P < 0,05$; značajno različito od TBI + OTAPALO skupine, # $P < 0,05$; značajno različito od TBI + PIO1 skupine.

Western blot metodom analizirane su proteinske ekspresije I κ B α u parijetalnim korteksima i hipokampusima štakora istraživanih eksperimentalnih skupina 24 sata nakon eksperimentalne TBI. Analiza varijanci nije pokazala značajan utjecaj primjene pioglitazona na razine ekspresije navedenog parametra u testiranim moždanim strukturama (parijetalni korteks [F(2,12) = 0,736; P = 0,499]; hipokampus [F(2,12) = 0,138; P = 0,872]) (Slika 29.).

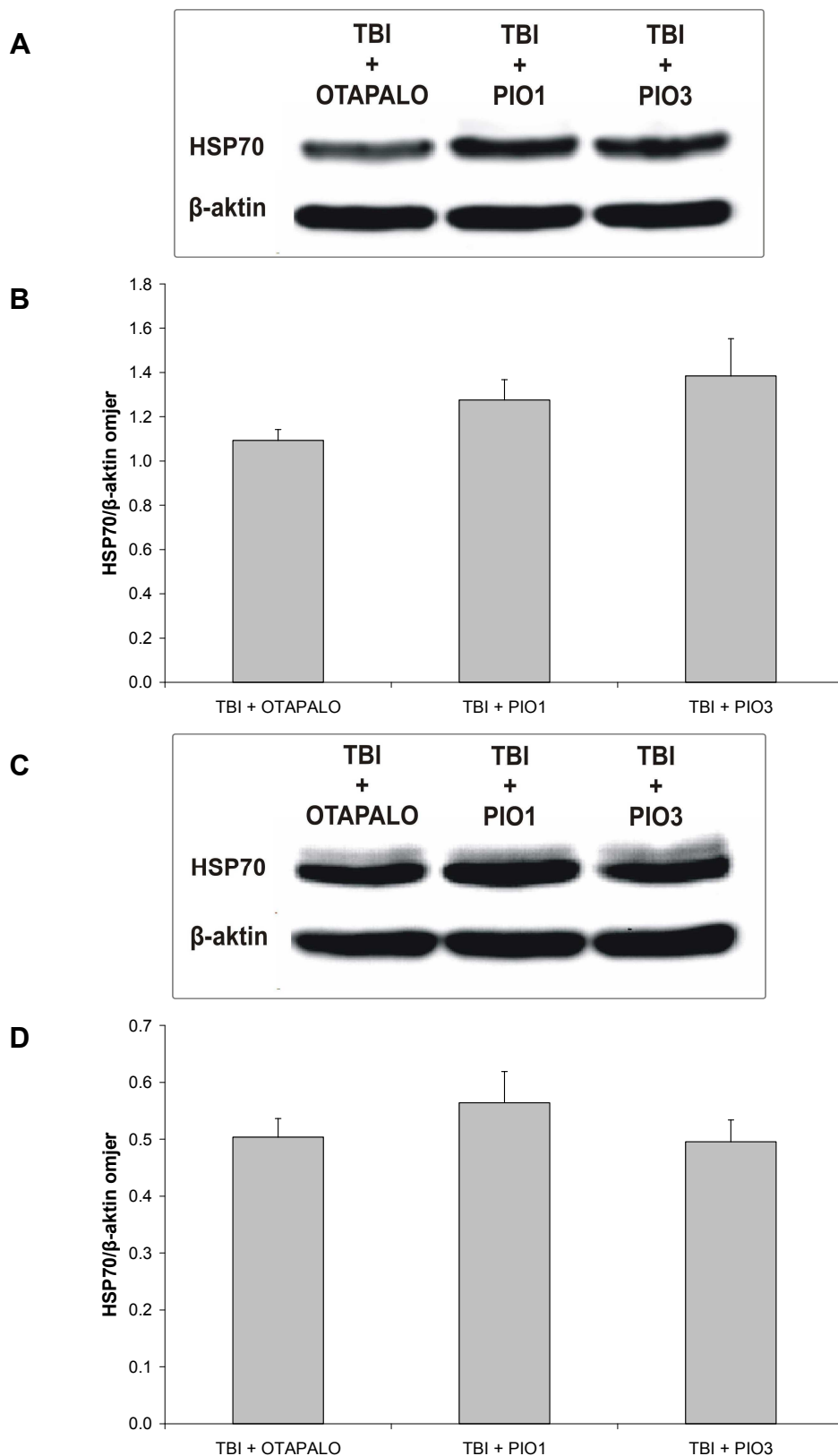
Tretman pioglitazonom nije utjecao niti na razine ekspresije HSP70 u parijetalnom korteksu [F(2,12) = 1,656; P = 0,232] i hipokampusu [F(2,12) = 0,757, P = 0,490] životinja s TBI. Naime, razine ekspresija navedenog proteina u životinja s TBI tretiranih testiranim PPAR γ agonistom u dozi od 1 ili 3 mg/kg nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na vrijednosti eksperimentalno ozlijeđenih životinja kojima je injicirano otapalo (Slika 30.).

U parijetalnom korteksu i hipokampusu životinja istraživanih skupina analizirane su ekspresije proBDNF i mBDNF. U parijetalnom korteksu zabilježen je značajan utjecaj tretmana na razinu proBDNF [F(2,12) = 4,064, P = 0,045]. U ovoj regiji ekspresija proBDNF bila je značajno veća u štakora tretiranih objema dozama lijeka u odnosu na ozlijeđene životinje kojima je injicirano otapalo (Slika 31.B). Suprotno navedenom, u hipokampusu nisu zabilježene značajne promjene ekspresije istraživanog proneurotrofina [F(2,12) = 1,058; P = 0,377] u životinja tretiranih korištenim glitazonom u odnosu na štakore s TBI, a kojima je aplicirano otapalo (Slika 31.D).

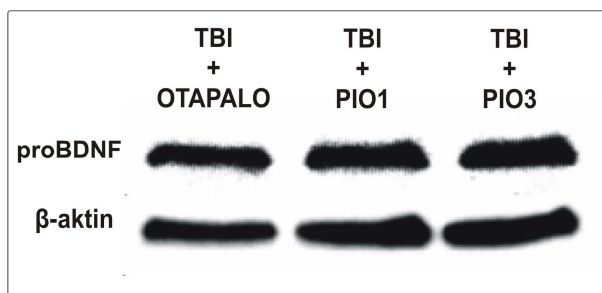
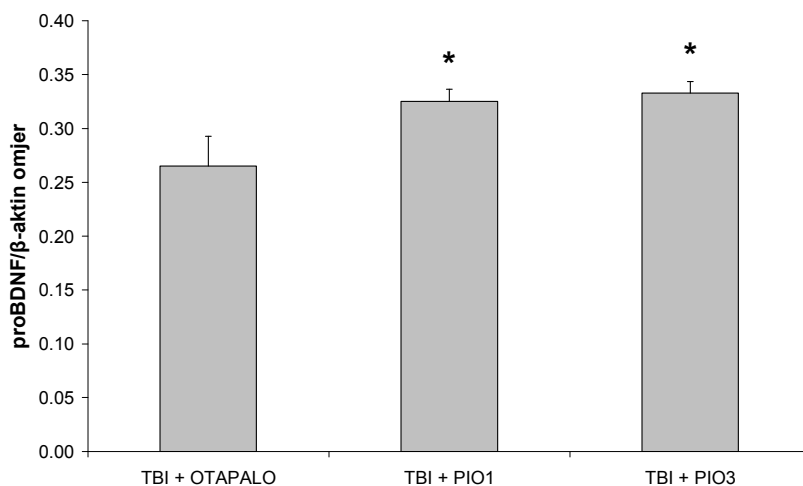
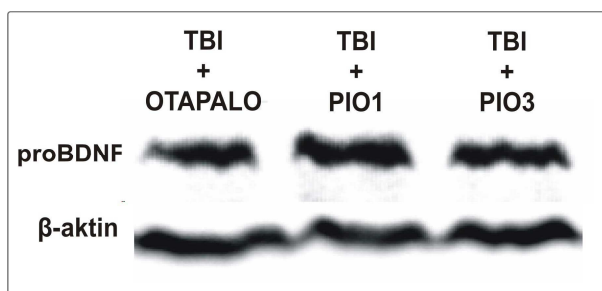
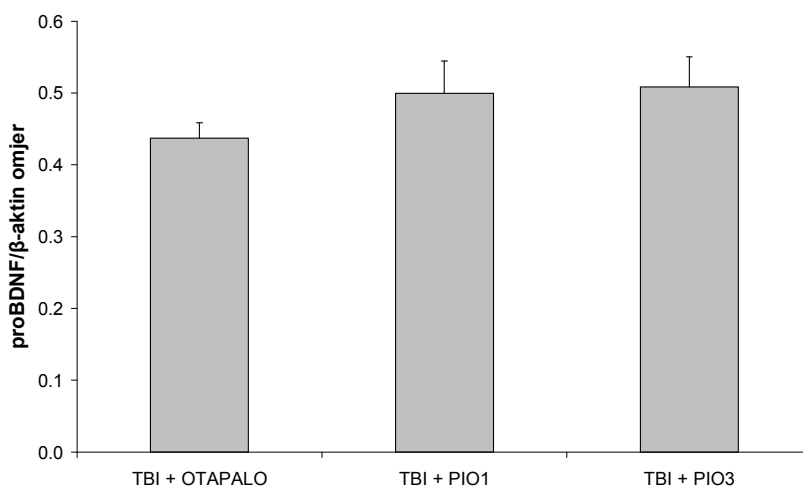
Glede analize ekspresije mBDNF i utjecaja tretmana, značajne razlike između pojedinih eksperimentalnih skupina zabilježene su u hipokampusu [F(2,12) = 12,744; P = 0,001], ali ne i u parijetalnom korteksu [F(2,12) = 2,351; P = 0,138] (Slika 32.). Primjena obje doze pioglitazona značajno je povećala sadržaj mBDNF u hipokampusima ozlijeđenih životinja u odnosu na vrijednosti izmjerene u istoj regiji otapalom tretiranih, ozlijeđenih životinja.



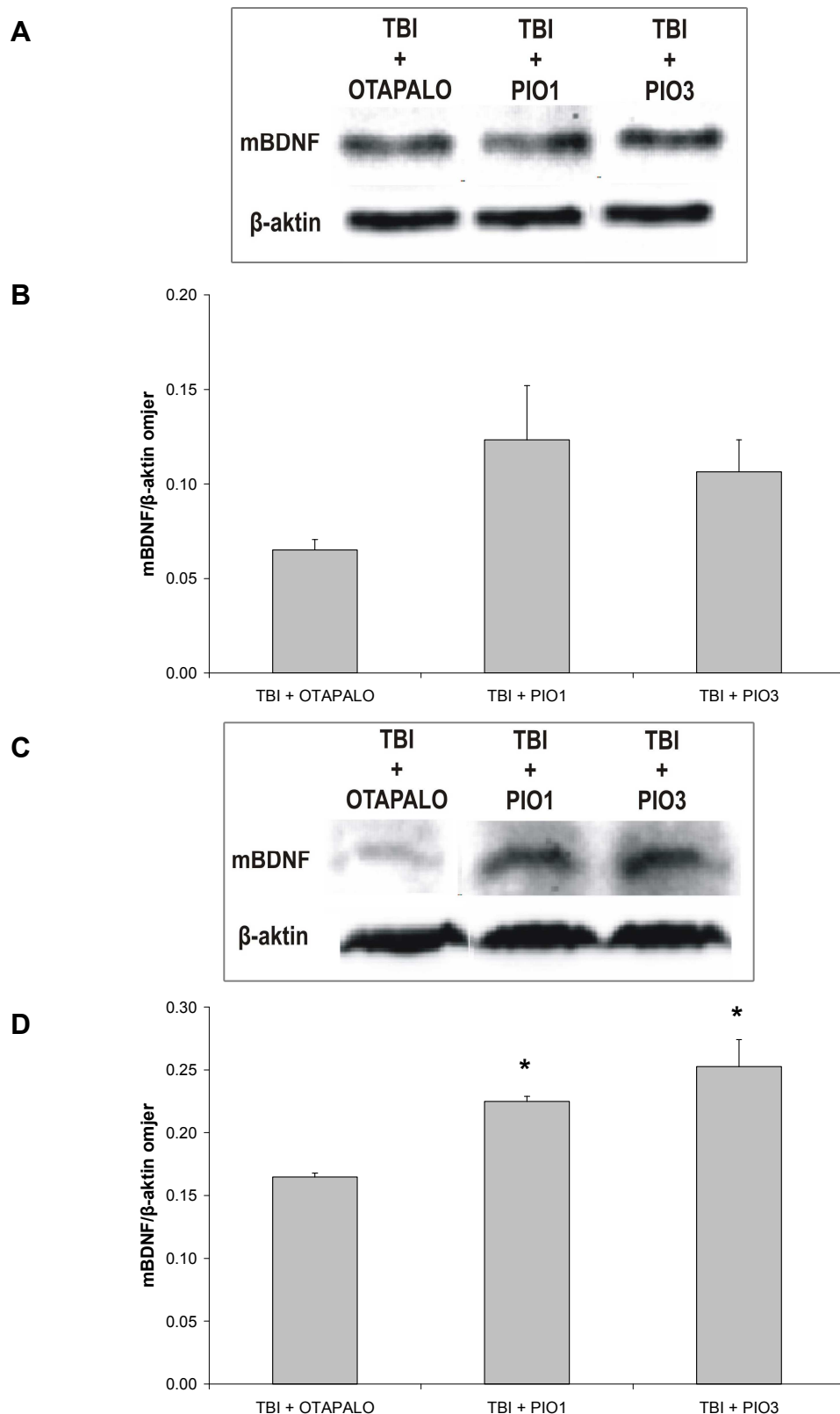
Slika 29. Učinak pioglitazona na ekspresije $\text{IkB}\alpha$ u parijetalnom korteksu (A-B) i hipokampusu (C-D) štakora 24 h nakon TBI. (A, C) Reprezentativni blotovi analize ekspresije $\text{IkB}\alpha$. (B, D) Densitometrijske analize blotova $\text{IkB}\alpha$ ($\text{IkB}\alpha/\beta\text{-aktin}$ omjer). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SEM ($n = 5$). Štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO); štakori s TBI tretirani pioglitazonom u dozi od 1 mg/kg (TBI + PIO1) ili 3 mg/kg (TBI + PIO3).



Slika 30. Učinak pioglitazona na ekspresije HSP70 u parijetalnom korteksu (A-B) i hipokampusu (C-D) štakora 24 h nakon TBI. (A, C) Reprezentativni blotovi analize ekspresije HSP70. (B, D) Denzitometrijske analize blotova HSP70 (HSP70/β-aktin omjer). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SEM ($n = 5$). Štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO); štakori s TBI tretirani pioglitazonom u dozi od 1 mg/kg (TBI + PIO1) ili 3 mg/kg (TBI + PIO3).

A**B****C****D**

Slika 31. Učinak pioglitazona na ekspresije proBDNF u parijetalnom korteksu (A-B) i hipokampusu (C-D) štakora 24 h nakon TBI. (A, C) Reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina. (B, D) Densitometrijske analize blotova proBDNF (proBDNF/β-aktin omjer). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti ± SEM (n = 5). Štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO) ili pioglitazonom u dozi od 1 mg/kg (TBI + PIO1) ili 3 mg/kg (TBI + PIO3). * $P < 0,05$; značajno različito od TBI + OTAPALO skupine.



Slika 32. Učinak pioglitazona na ekspresije mBDNF u parijetalnom korteksu (A, B) i hipokampusu (C, D) štakora 24 h nakon TBI. (A, C) Reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina. (B, D) Denzitometrijske analize blotova mBDNF (mBDNF/β-aktin omjer). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SEM ($n = 5$). Štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO) ili pioglitazonom u dozi od 1 mg/kg (TBI + PIO1) ili 3 mg/kg (TBI + PIO3). * $P < 0,05$; značajno različito TBI + OTAPALO skupine.

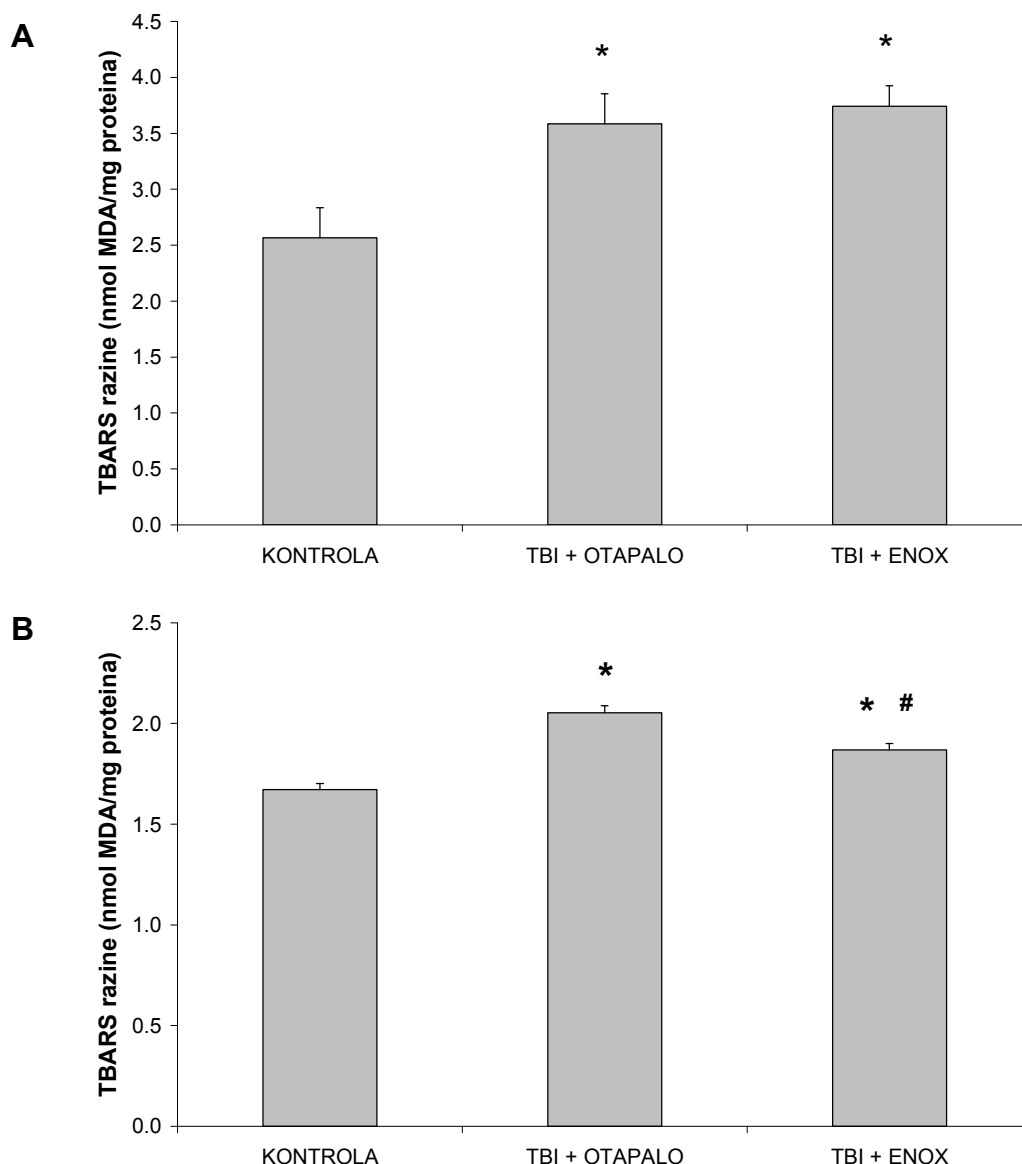
4.3. Utjecaj enoksaparina na pokazatelje moždanog oštećenja i endogene neuroprotekcije u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga

4.3.1. Utjecaj enoksaparina na oksidativno oštećenje lipida i proteina u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga

Na slici 33. prikazani su rezultati mjerenja razina produkata lipidne peroksidacije u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora kontrolne skupine (lažno operirane životinje kojima je injicirano otapalo), odnosno štakora s eksperimentalnom TBI tretiranih otapalom ili enoksaparinom. Jednosmjerna ANOVA pokazala je statistički značajan utjecaj tretmana na kortikalne razine TBARS [$F(2,21) = 6,806$; $P = 0,005$] u našim eksperimentalnim uvjetima. Duncan test višestruke usporedbe pokazao je da su razine TBARS u parijetalnim korteksima ozlijeđenih životinja, tretiranih otapalom ili enoksaparinom, bile značajno više u odnosu na vrijednosti izmjerene u štakora kontrolne skupine. Primjena istraživanog heparina niske molekularne mase nije značajno utjecala na kortikalnu razinu ovog parametra u štakora s TBI.

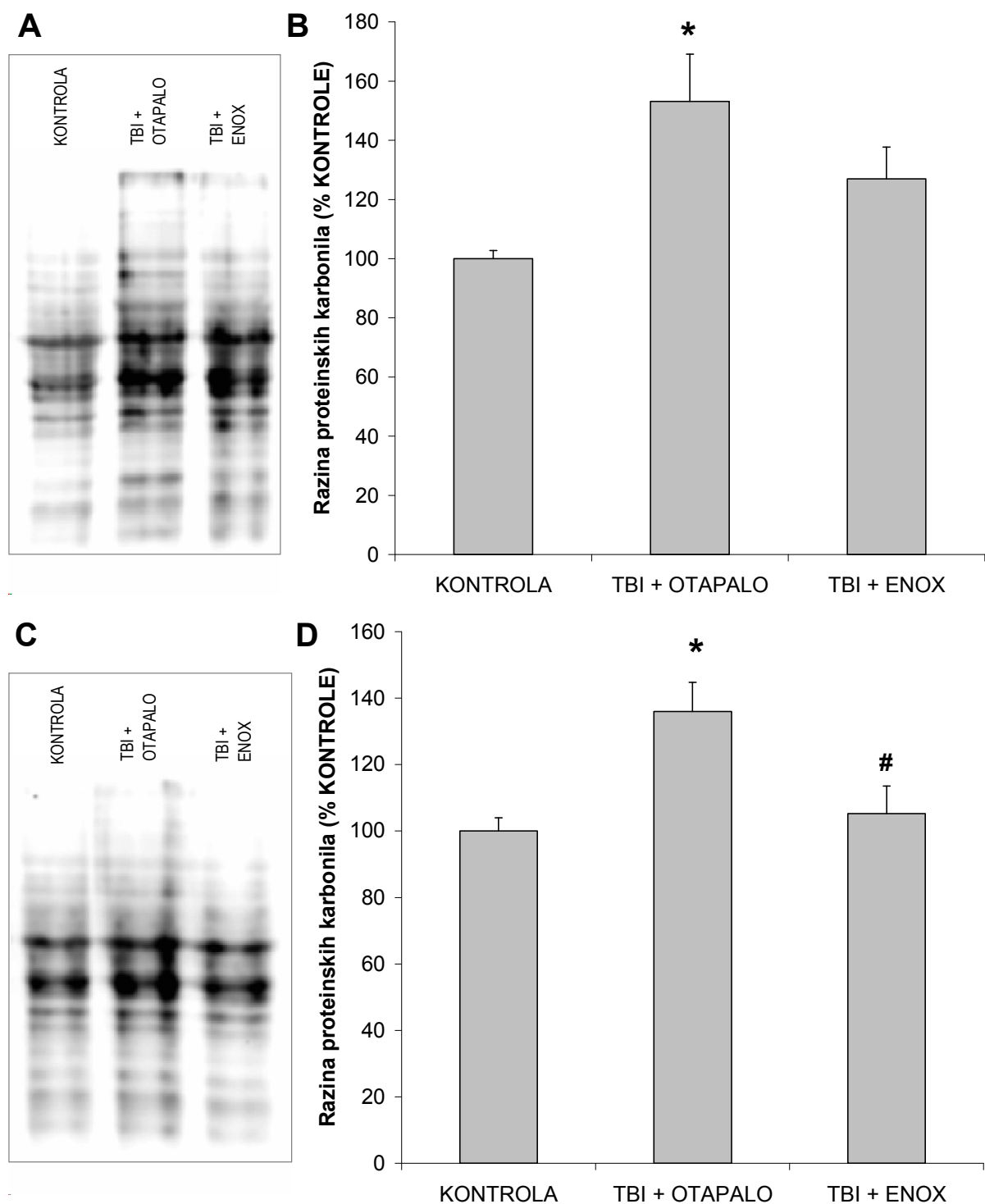
Statističke analize rezultata, dobivenih mjerenjem razine TBARS u uzorcima hipokampusa životinja pojedinih eksperimentalnih skupina, pokazale su značajan utjecaj traume, odnosno primjene lijeka u ovoj regiji mozga [$F(2,21) = 34,763$; $P < 0,001$]. Naime, pojedinačna usporedba srednjih vrijednosti ukazala je da je trauma mozga značajno povisila razine TBARS u svih ozlijeđenih životinja u odnosu na kontrolnu skupinu, ali i da je primjena enoksaparina značajno smanjila razinu mjenog parametra oksidativnog oštećenja lipida u usporedbi s vrijednostima ozlijeđenih životinja injiciranih otapalom (Slika 33.).

Na slici 34. prikazani su reprezentativni blotovi i denzitometrijske analize razine proteinskih karbonilnih skupina, markera oksidacije proteina, u parijetalnom korteksu i hipokampusu životinja istraživanih eksperimentalnih skupina. Statistički značajan utjecaj



Slika 33. Učinak enoksaparina na razine TBARS (nmol MDA/mg proteina) u parijetalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) 48 h nakon TBI. Kontrolna skupina (KONTROLA); štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO) ili enoksaparinom (TBI + ENOX). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SEM ($n = 8$). * $P < 0,05$; značajno različito od kontrolne skupine; # $P < 0,05$; značajno različito od TBI + OTAPALO skupine.

tretmana na razine oksidiranih proteina zamijećen je u obje testirane regije mozga eksperimentalnih životinja (parijetalni korteks [$F(2,10) = 4,795$; $P = 0,035$]; hipokampus [$F(2,12) = 6,986$; $P = 0,010$]). U ozlijeđenih se životinja, 48 sati nakon indukcije TBI, razina oksidiranih proteina povećala na $153,08 \pm 15,93$ % u parijetalnom korteksu, odnosno na $135,98 \pm 8,79$ % u hipokampusu u usporedbi s vrijednostima kontrolne skupine (100 %). Iz rezultata je razvidno da je enoksaparin značajno smanjio oksidativno oštećenje proteina u

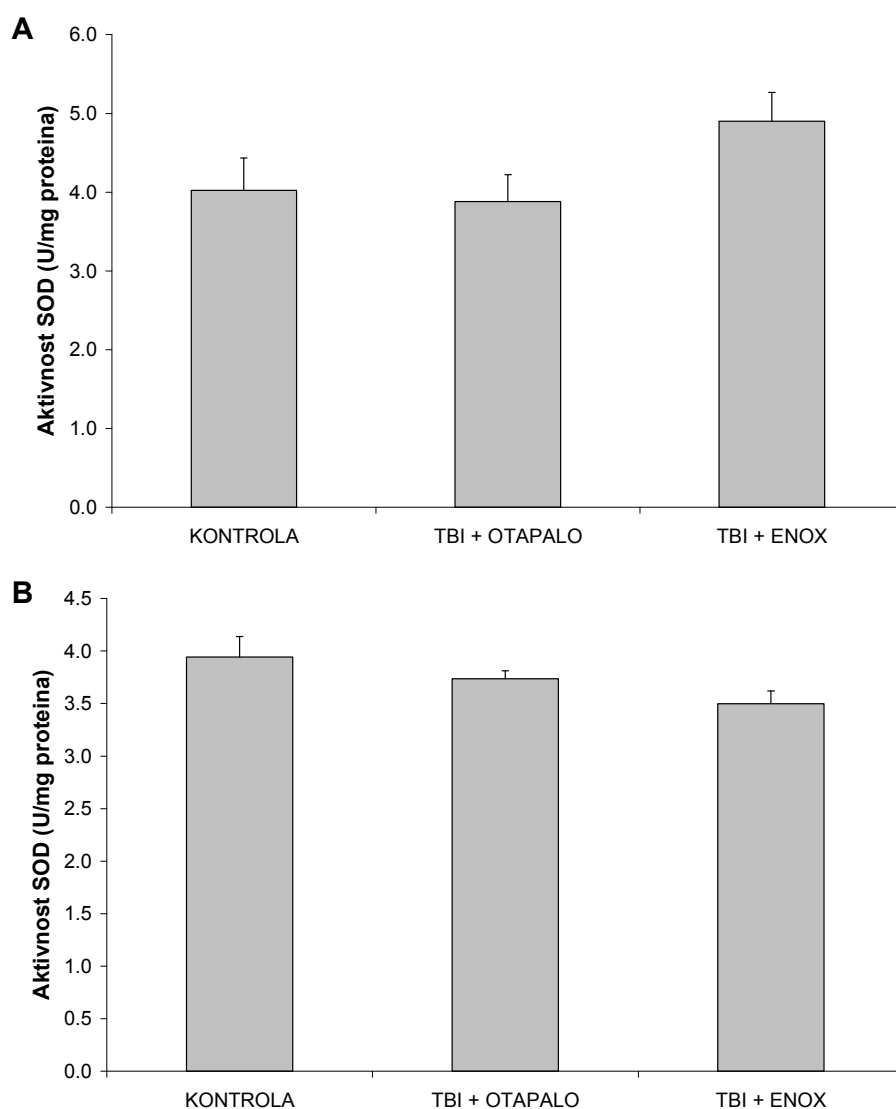


Slika 34. Učinak enoksaparina na razine oksidiranih proteina u parijetalnom korteksu (A, B) i hipokampusu (C, D) 48 h nakon TBI u štakora. Prikazani su reprezentativni blotovi (A, C) i pripadajuće denzitometrijske analize (B, D). Kontrolna skupina (KONTROLA); štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO) ili enoksaparinom (TBI + ENOX). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SEM ($n = 4-5$). * $P < 0,05$; značajno različito od kontrolne skupine; # $P < 0,05$; značajno različito od TBI + OTAPALO skupine.

hipokampusu, ali ne i u parijetalnom korteksu. Hipokampalni sadržaj karbonilnih skupina bio je pod utjecajem lijeka znatno smanjen, te je dosegao razinu blizu vrijednosti kontrolne skupine ($105,23 \pm 8,31 \%$).

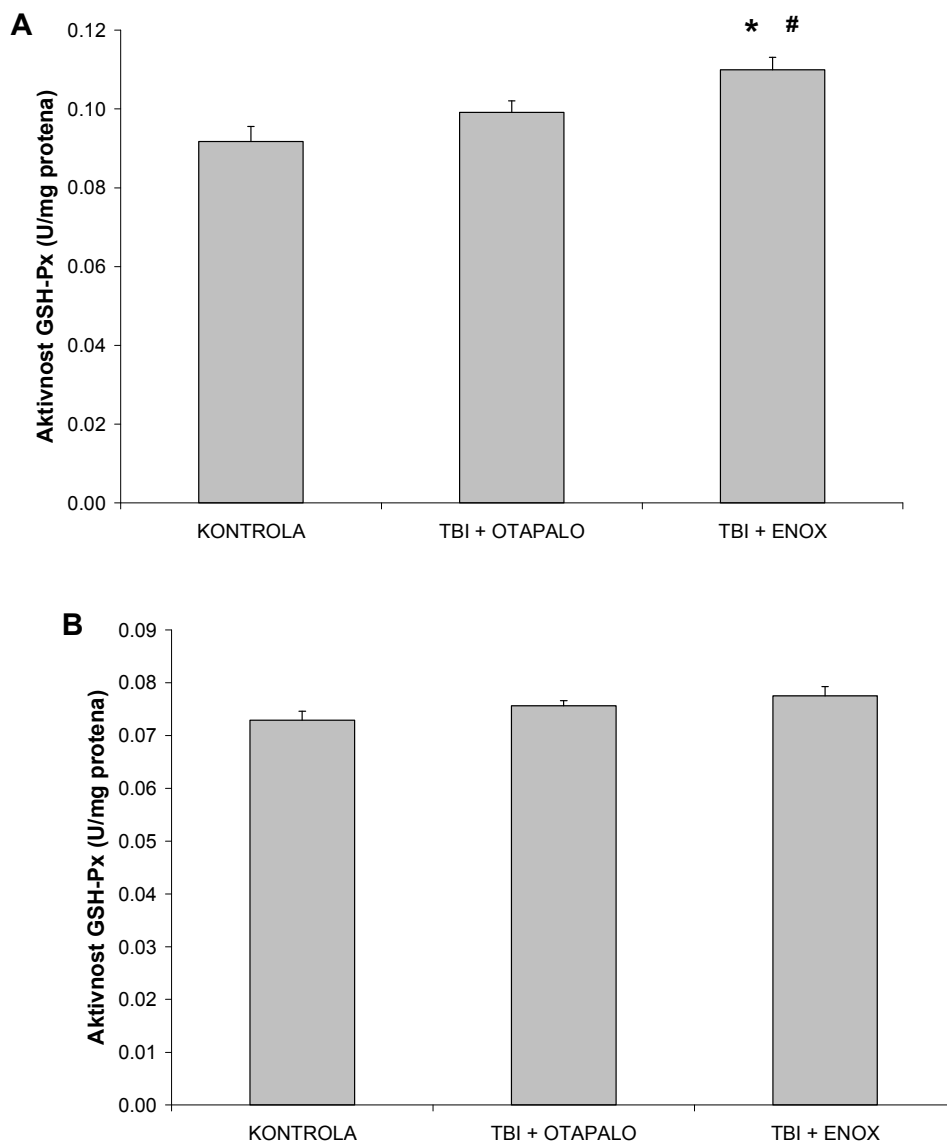
4.3.2. Utjecaj enoksaparina na aktivnosti antioksidativnih enzima u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga

U našem istraživanju analizirali smo i aktivnosti antioksidativnih enzima SOD i GSH-Px u parijetalnom korteksu i hipokampusu životinja s TBI, a tretiranih enoksaparinom.



Slika 35. Učinak enoksaparina na aktivnosti SOD (U/mg proteina) u parijetalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) štakora 48 h nakon TBI. Kontrolna skupina (KONTROLA); štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO) ili enoksaparinom (TBI + ENOX). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SEM ($n = 8$).

Jednosmjerna ANOVA nije pokazala značajan utjecaj tretmana na razine aktivnosti SOD u obje testirane regije (parijetalni korteks [$F(2,21) = 2,187$; $P = 0,137$]; hipokampus [$F(2,21) = 2,506$; $P = 0,106$]) (Slika 35.). Suprotno navedenom, kortikalna aktivnost drugog istraživanog antioksidativnog enzima, GSH-Px, značajno se mijenjala pod utjecajem tretmana [$F(2,21) = 7,569$; $P = 0,003$].



Slika 36. Učinak enoksaparina na aktivnosti GSH-Px (U/mg proteina) u parijetalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) štakora 48 h nakon TBI. Kontrolna skupina (KONTROLA); štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO) ili enoksaparinom (TBI + ENOX). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SEM ($n = 8$). * $P < 0,05$; značajno različito od kontrolne skupine; # $P < 0,05$; značajno različito od TBI + OTAPALO skupine.

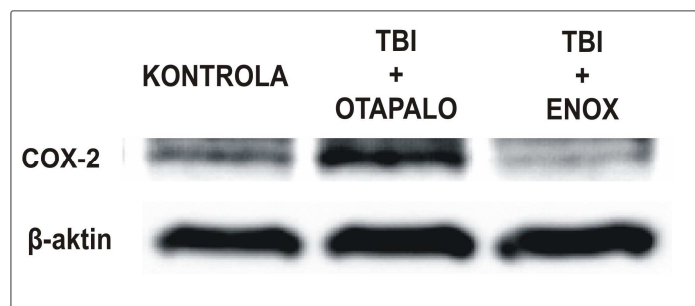
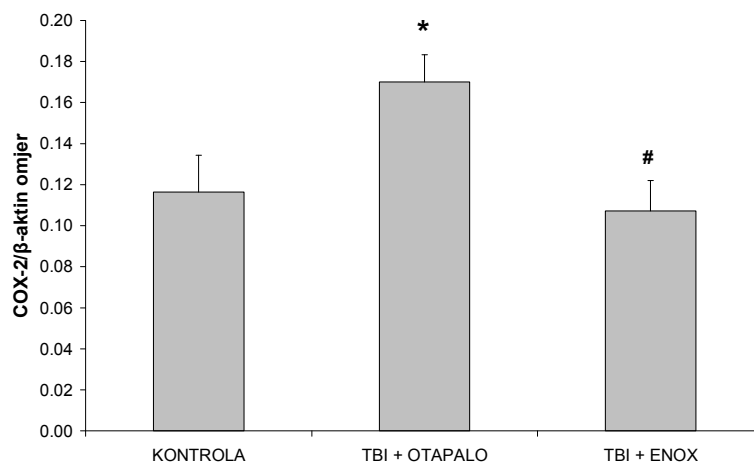
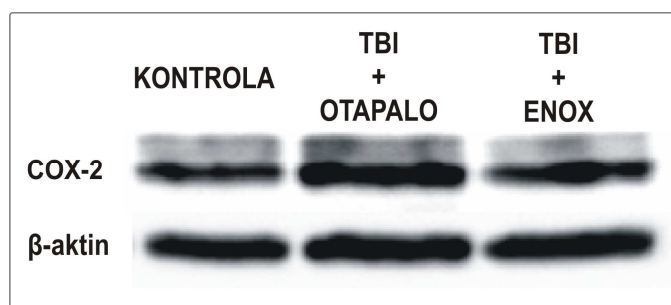
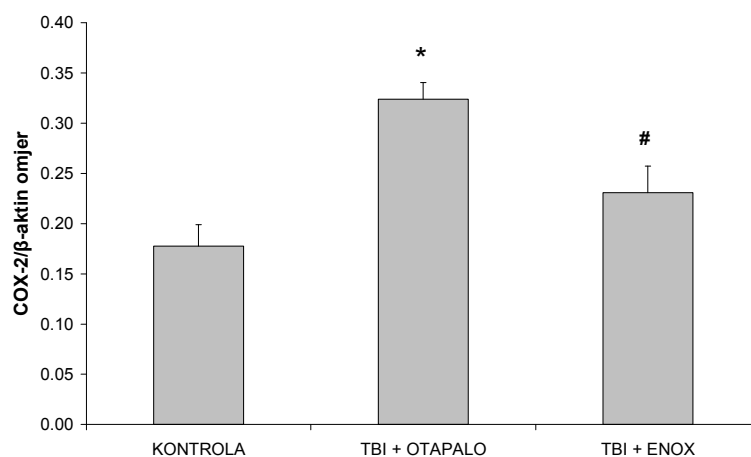
Naime, primjena enoksaparina značajno je povećala aktivnost GSH-Px u parijetalnom korteksu ozlijeđenih životinja u odnosu na vrijednost zabilježenu u životinja kontrolne skupine, ali i u odnosu na otapalom tretirane ozlijeđene štakore (Slika 36.A). Aktivnosti istog enzima detektirane u hipokampusima životinja uspoređivanih eksperimentalnih skupina nisu se značajno razlikovale [$F(2,21) = 2,506$; $P = 0,106$] (Slika 36.B).

4.3.3. Utjecaj enoksaparina na razine ekspresija proteina od interesa u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga

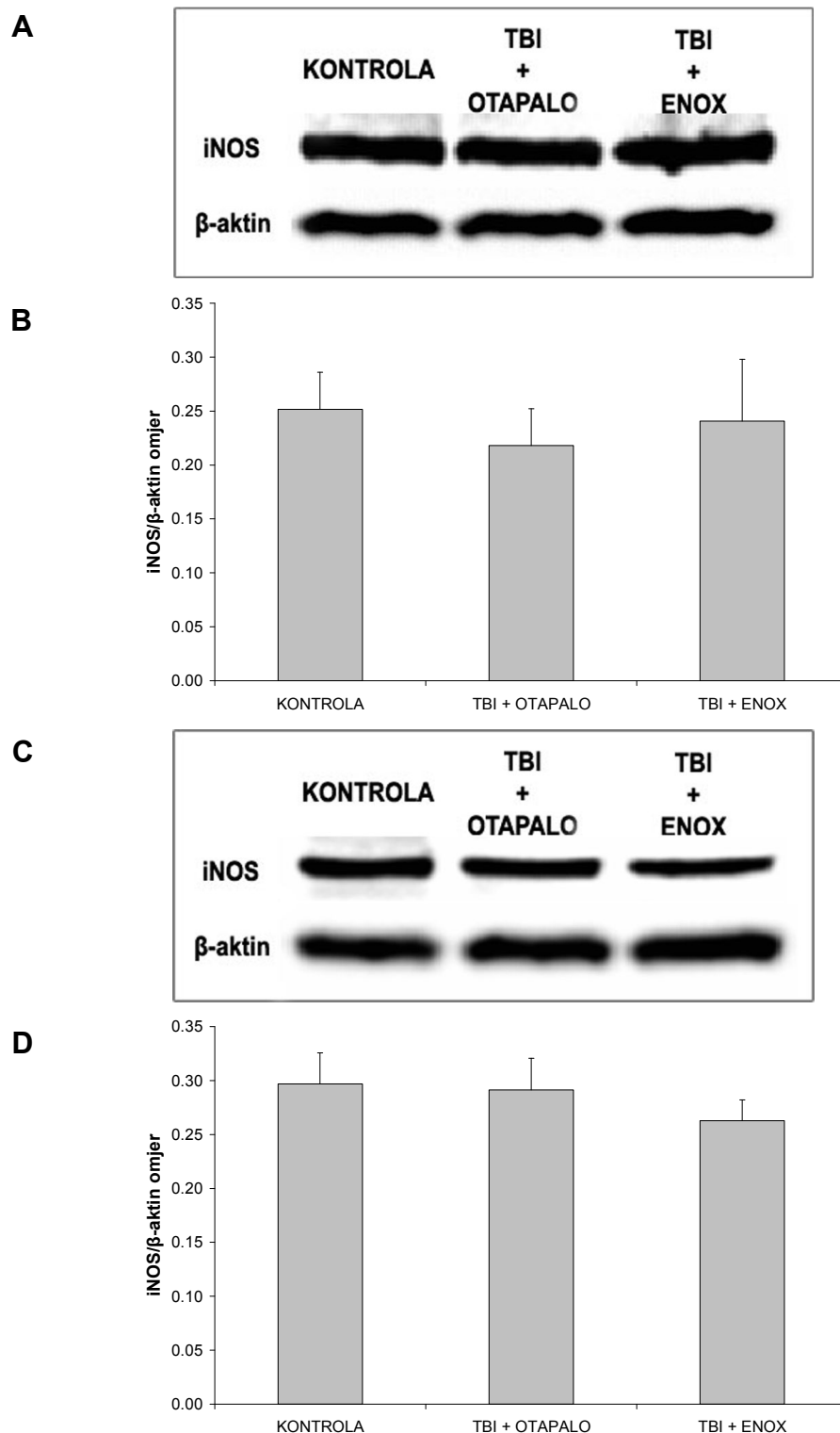
Western blot metodom analizirane su ekspresije proupalnog COX-2 enzima u parijetalnom korteksu i hipokampusu životinja testiranih eksperimentalnih skupina, 48 sata nakon indukcije traume, odnosno lažne ozljede (Slika 37.). Statističke analize pokazale su značajan utjecaj traume, odnosno primjene lijeka na istraživani upalni parametar (parijetalni korteks [$F(2,9) = 4,850$; $P = 0,037$]; hipokampus [$F(2,11) = 12,803$; $P = 0,001$]). Pojedinačna usporedba srednjih vrijednosti korištenjem Duncan testa, pokazala je da je eksperimentalna TBI značajno povećala ekspresiju COX-2 proteina u obje istraživane regije mozga. Također u obje moždane strukture, primjena enoksaparina značajno je utjecala na smanjenje pojačane ekspresije istraživanog proteina (Slika 37.).

Jednosmjerna ANOVA pokazala je da, u našim eksperimentalnim uvjetima, nema značajnih razlika u ekspresijama iNOS proteina između istraživanih skupina životinja, niti u jednoj od analiziranih regija (parijetalni korteks [$F(2,11) = 0,142$; $P = 0,869$]; hipokampus [$F(2,12) = 0,490$; $P = 0,624$]) (Slika 38.).

Na slici 39. prikazani su reprezentativni blotovi i pripadajuće denzitometrijske analize ekspresija I κ B α u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora kontrolne skupine, odnosno životinja s eksperimentalnom TBI kojima su injicirani enoksaparin ili otapalo. Statistički značajan učinak tretmana uočava se u parijetalnom korteksu [$F(2,12) = 13,880$; $P < 0,001$],

A**B****C****D**

Slika 37. Učinak enoksaparina na ekspresije COX-2 u parijetalnom korteksu (A, B) i hipokampusu (C, D) štakora 48 h nakon TBI. (A, C) Reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina. (B, D) Denzitometrijske analize blotova COX-2 (COX-2/β-aktin omjer). Kontrolna skupina (KONTROLA); štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO) ili enoksaparinom (TBI + ENOX). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti ± SEM (n = 4-5). * $P < 0,05$; značajno različito od kontrolne skupine; # $P < 0,05$; značajno različito od TBI + OTAPALO skupine.

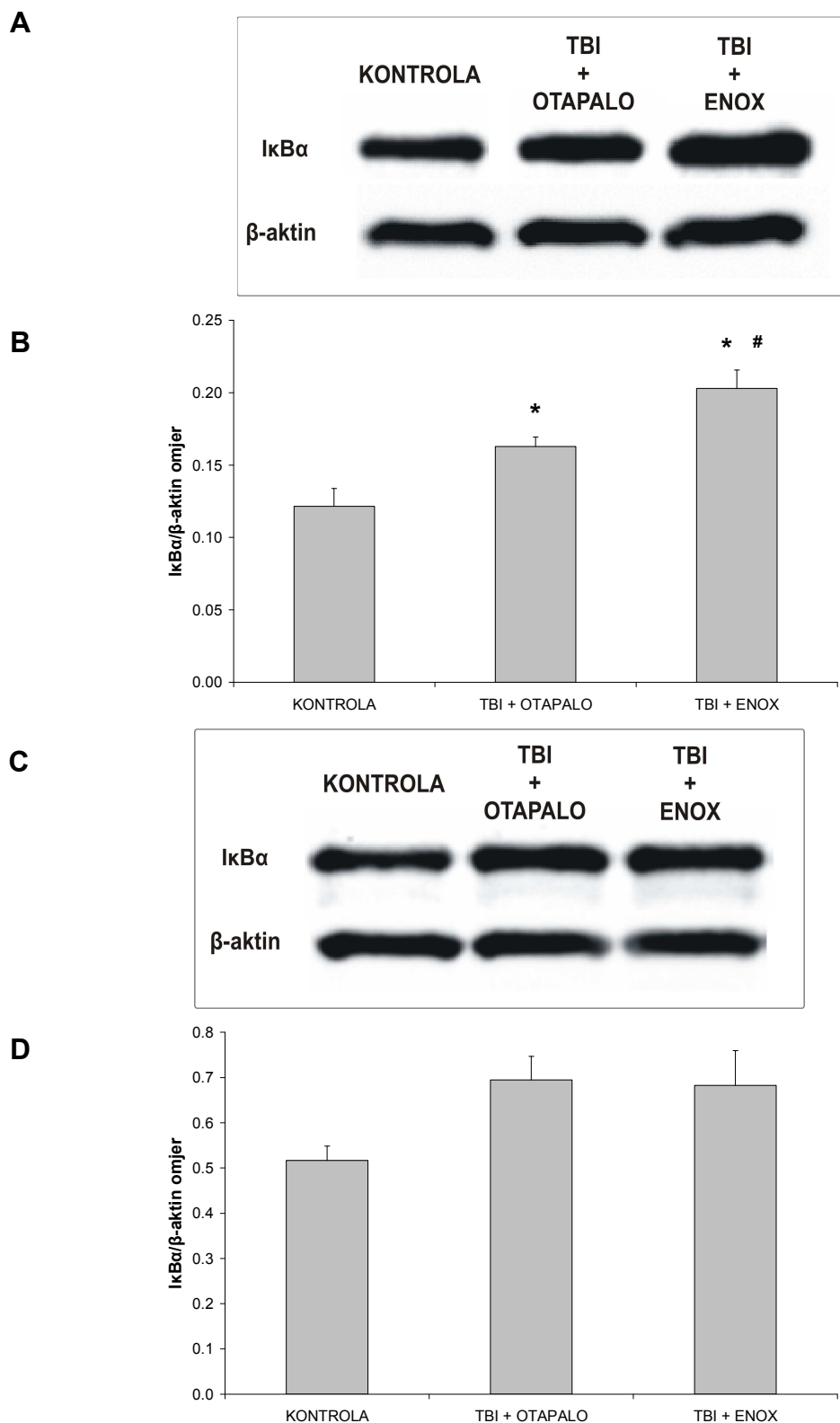


Slika 38. Učinak enoksaparina na ekspresije iNOS u parijetalnom korteksu (A, B) i hipokampusu (C, D) štakora 48 h nakon TBI. (A, C) Reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina. (B, D) Densitometrijske analize blotova iNOS (iNOS/β-aktin omjer). Kontrolna skupina (KONTROLA); štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO) ili enoksaparinom (TBI + ENOX). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti ± SEM (n = 4-5).

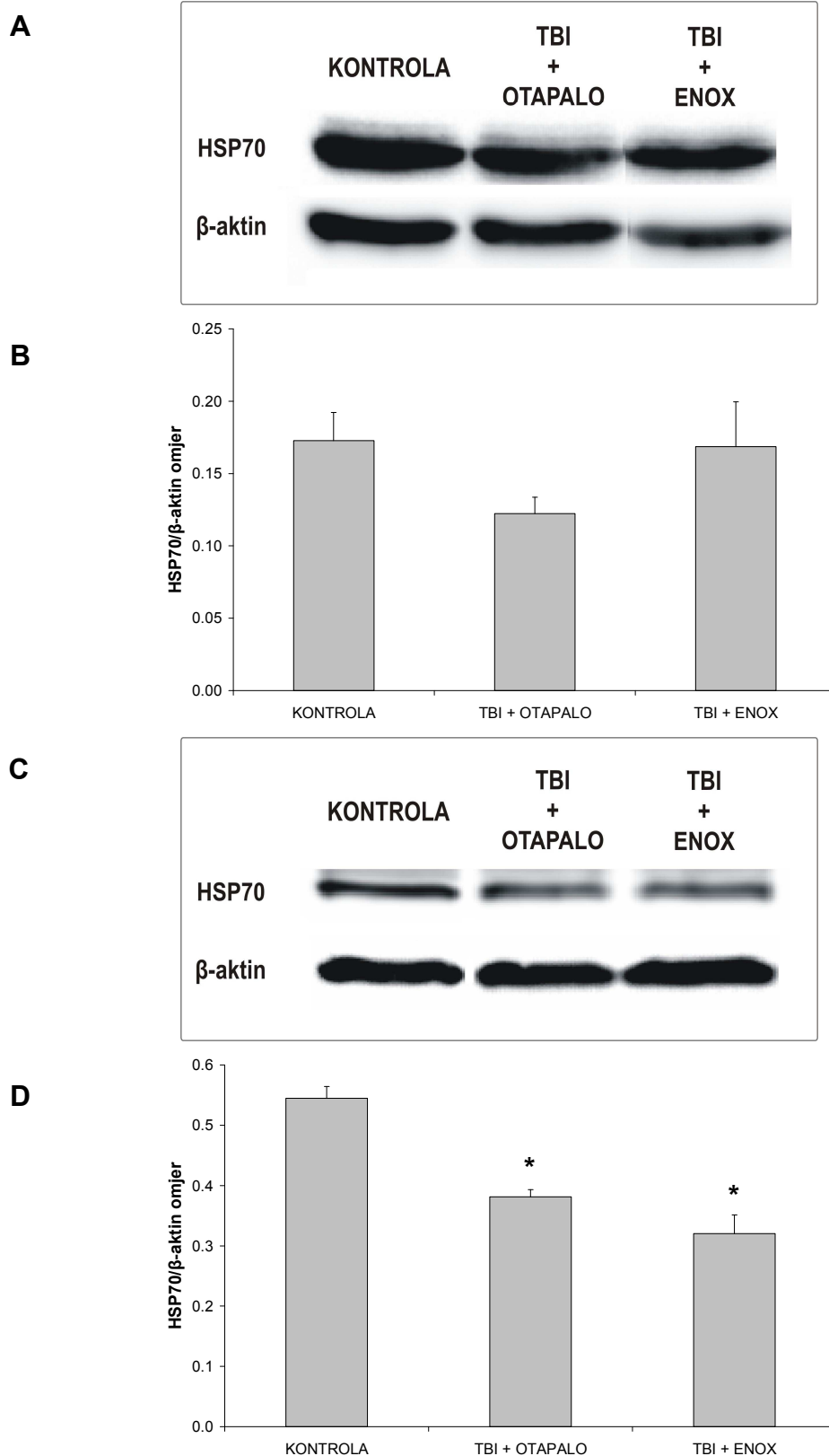
ali ne i u hipokampusu [$F(2,12) = 3,092$; $P = 0,083$] životinja testiranih eksperimentalnih skupina. Naime, u parijetalnom korteksu, traumatska ozljeda značajno je utjecala na pojačanu ekspresiju istraživanog inhibitora NF κ B signalnog puta, dok je tretman enoksaparinom dodatno inducirao povećanje sadržaja I κ B α (Slika 39.B). Stoga je u parijetalnom korteksu životinja s TBI, a tretiranih enoksaparinom, zabilježena viša razina ekspresije I κ B α i u odnosu na ozlijeđene, otapalom injicirane životinje (Slika 39.B).

Rezultati mjerenja ekspresije HSP70 proteina u parijetalnom korteksu i hipokampusu pojedinih eksperimentalnih skupina životinja prikazani su na slici 40. Dok u parijetalnom korteksu nisu zamijećene razlike u sadržaju navedenog proteina između pojedinih skupina životinja [$F(2,11) = 1,931$; $P = 0,191$], statističkim je analizama detektiran značajan učinak tretmana na hipokampalne razine HSP70 [$F(2,12) = 13,171$; $P < 0,001$]. Naime, trauma mozga značajno je smanjila ekspresiju HSP70 u hipokampusu, a primjena lijeka u ozlijeđenih životinja nije značajno utjecala na hipokampalnu razinu ovog neuroprotektivnog proteina, te je ona i uz primjenu enoksaparina bila značajno niža u odnosu na vrijednosti detektirane u životinja kontrolne skupine (Slika 40.D).

Rezultati analiza ekspresija proBDNF u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora tretiranih enoksaparinom ili otapalom i podvrgnutih eksperimentalnoj TBI, odnosno životinja kontrolne skupine, prikazani su na slici 41. Statističke analize dobivenih rezultata pokazale su značajan utjecaj tretmana na ekspresije proBDNF proteina u obje istraživane regije mozga (parijetalni korteks [$F(2,12) = 3,919$; $P = 0,049$]; hipokampus [$F(2,12) = 4,085$; $P = 0,044$]). Duncan testom višestruke usporedbe utvrđeno je da je trauma mozga značajno smanjila ekspresiju ovog proneurotrofina u parijetalnom korteksu, u odnosu na vrijednosti detektiraneu životinja kontrolne skupine (Slika 41.). Kortikalni sadržaj proBDNF proteina u štakora tretiranih enoksaparinom nije se značajno razlikovao od vrijednosti u kontrolne skupine



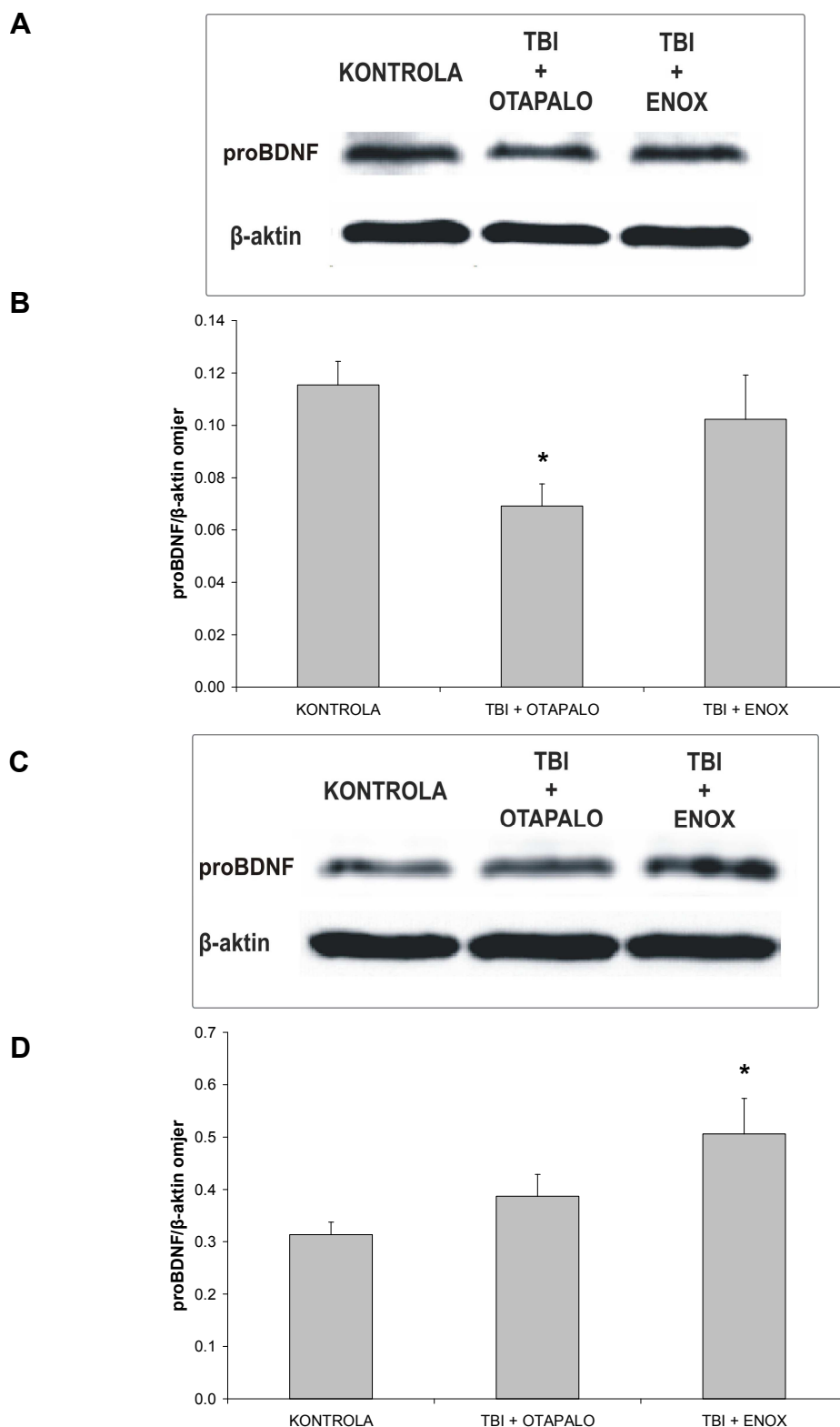
Slika 39. Učinak enoksaparina na ekspresije IkBα u parijetalnom korteksu (A, B) i hipokampusu (C, D) štakora 48 h nakon TBI. (A, C) Reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina. (B, D) Denzitometrijske analize blotova IkBα (IkBα/β-aktin omjer). Kontrolna skupina (KONTROLA); štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO) ili enoksaparinom (TBI + ENOX). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti ± SEM (n = 4-5). * $P < 0,05$; značajno različito od kontrolne skupine; # $P < 0,05$; značajno različito od TBI + OTAPALO skupine.



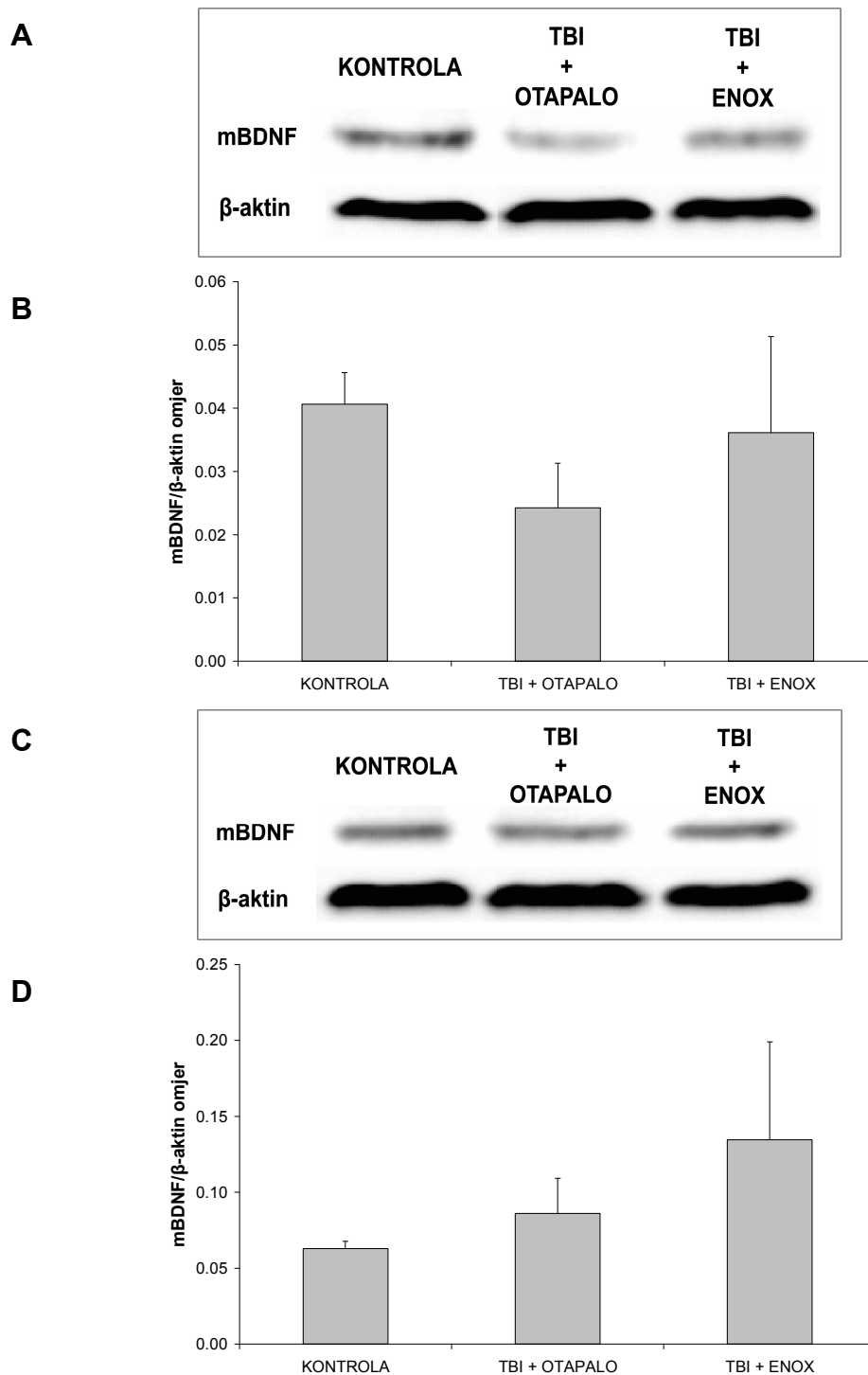
Slika 40. Učinak enoksaparina na ekspresije HSP70 u parijetalnom korteksu (A, B) i hipokampusu (C, D) štakora 48 h nakon TBI. (A, C) Reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina. (B, D) Denzitometrijske analize blotova HSP70 (HSP70 /β-aktin omjer). Kontrolna skupina (KONTROLA); štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO) ili enoksaparinom (TBI + ENOX). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti ± SEM (n = 5). * $P < 0,05$; značajno različito od kontrolne skupine.

životinja. Iako je u lijekom tretiranih štakora opaženo povišenje razine ekspresije proBDNF proteina, nije utvrđena statistička značajna razlika u odnosu na otapalom tretirane, ozlijeđene životinje ($P = 0,076$) (Slika 41.B). Primjena enoksaparina uzrokovala je statistički značajno povećanje ekspresije proBDNF u hipokampusu ozlijeđenih životinja u odnosu na vrijednosti štakora kontrolne skupine. Razina ekspresije proBDNF u hipokampusu ozlijeđenih životinja tretiranih enoksaprinom nije se značajno razlikovala od vrijednosti razina ekspresije proteina u štakora s TBI, a tretiranih otapalom.

Ekspresija mBDNF proteina u obje testirane regije nije se značajno mijenjala pod utjecajem TBI, odnosno primjene lijeka (parijetalni korteks [$F(2,12) = 0,705$; $P = 0,514$]; hipokampus [$F(2,11) = 1,043$; $P = 0,385$]) (Slika 42.).



Slika 41. Učinak enoksaparina na ekspresije proBDNF u parijetalnom korteksu (A, B) i hipokampusu (C, D) štakora 48 h nakon TBI. (A, C) Reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina. (B, D) Denzitometrijske analize blotova proBDNF (proBDNF /β-aktin omjer). Kontrolna skupina (KONTROLA); štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO) ili tretirani enoksaparinom (TBI + ENOX). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti ± SEM (n = 5). * $P < 0,05$; značajno različito od kontrolne skupine.



Slika 42. Učinak enoksaparina na ekspresije mBDNF u parijetalnom korteksu (A, B) i hipokampusu (C, D) štakora 48 h nakon TBI. (A, C) Reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina. (B, D) Denzitometrijske analize blotova mBDNF (mBDNF/β-aktin omjer). Kontrolna skupina (KONTROLA); štakori s TBI tretirani otapalom (TBI + OTAPALO) ili tretirani enoksaparinom (TBI + ENOX). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti ± SEM (n = 4-5).

5. Rasprava

5.1. Utjecaj traumatske ozljede mozga na pokazatelje moždanog oštećenja i endogene neuroprotekcije u različitim moždanim strukturama štakora

Rezultati naših istraživanja utjecaja LFP ozljede na oštećenje mozga pokazali su da su ipsilateralni parijetalni korteks i hipokampus najjače oštećene strukture mozga 24 sata nakon TBI. Naime, histološka analiza tkiva mozga ukazuje da su u navedenom vremenskom razdoblju upravo ove dvije regije najjače pogođene ozljedom, što se očituje gubitkom neurona, razdorom KMB, pojavom intraparenhimnog krvarenja, te infiltracijom upalnih stanica u ozlijeđeno tkivo. Rezultati analize sadržaja vode u moždanom tkivu, 48 sati nakon eksperimentalne TBI, pokazali su da je u ove dvije regije prisutan i značajan edem mozga. Za razliku od ostalih istraživanih moždanih struktura, parijetalni korteks i hipokampus su regije mozga u kojima se bilježi značajan utjecaj oksidativnog stresa i posljedičnog oštećenja lipida i proteina. Suprotno navedenom, upalni proces je u mozgu ozlijeđenih životinja nakon TBI difuzan, te su, osim u parijetalnom korteksu i hipokampusu, upalni infiltrat i stanice koje eksprimiraju proupalne markere, zabilježene i u talamusu i entorinalnom korteksu. Cerebelum, koji je najudaljeniji od mjesta primarne, mehaničke ozljede, također je zahvaćen traumom mozga. Osim značajnog povećanja tkivnog sadržaja vode, u ovoj se strukturi, nakon eksperimentalne TBI, zamjećuje i značajan gubitak protektivnog HSP70.

5.1.1. Utjecaj traumatske ozljede mozga na oksidativno oštećenje lipida i proteina u različitim moždanim strukturama štakora

Kisik je ključan element koji osigurava život svim aerobnim organizmima, pa tako i čovjeku. No, usprkos navedenom, prevelika količina kisika može imati toksične učinke (38). Naime, udisanjem zraka u organizam čovjeka unosi se kisik u koncentraciji od 21 %, koja, iako fiziološka, može uzrokovati oksidativna oštećenja DNA, lipida i proteina. Iako u

kontakta s kisikom proizvedeni pojedini reaktivni spojevi imaju važne uloge npr. u obrani organizma od infekcija i u koordinaciji upalnog odgovora, njihove prevelike količine povezane su s ozljedama tkiva (265). Nastali hidroksilni radikal, superoksidni anion, vodikov peroksid, peroksinitrit i brojni drugi ROS i RNS uzrokuju oksidativno oštećenje staničnih makromolekula. Stoga je za očuvanje biološke homeostaze u organizmima nužan balans između stalno prisutne proizvodnje različitih ROS i RNS s jedne i antioksidativnih sustava obrane s druge strane.

Rezultati istraživanja provedenih u sklopu ovog doktorskog rada pokazali su povećane razine TBARS i oksidiranih proteina u ipsilateralnom parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora, 24 sata nakon umjerene LFP ozljede. Navedeni rezultati u suglasju su s ranije objavljenim istraživanjima u kojima su detektirani različiti pokazatelji oksidativnog oštećenja moždanih lipida (266-269), odnosno proteina (42, 269-272), u navedenim strukturama mozga štakora, u različitim vremenskim intervalima nakon TBI.

Osim parijetalnog korteksa i hipokampusa, u LFP modelu TBI znakovi oštećenja tkiva i stanica pronađeni su i u talamusu (213, 214, 273-279), medijalnom septumu (280-281), strijatumu (273, 275, 279), amigdali (279) i cerebelumu (158, 277, 279, 282). S obzirom na navedeno, a i zbog činjenice da se neurodegenerativne promjene u mozgu uzrokovane TBI tijekom vremena šire na regije mozga udaljenije od mjesta primarne ozljede (274), jedna od pretpostavki naših istraživanja bila je da oksidativne promjene lipida i proteina imaju važnu ulogu u traumom uzrokovanom oštećenju tih moždanih struktura. U ovom su radu prvi put određivani pokazatelji oksidativnog stresa u talamusu, entorinalnom korteksu i cerebelumu, moždanim strukturama udaljenijim od samog mjesta udarca. Rezultati naših mjerenja pokazali su da lipidi i proteini navedenih regija mozga nisu bili oksidativno promijenjeni 24 sata nakon LFP ozljede. No, ovaj rezultat ne isključuje mogućnost nalaza lipidnog i proteinskog

oksidativnog oštećenja, u navedenim moždanim strukturama, u drugim vremenskim razdobljima nakon LFP ozljede.

5.1.2. Utjecaj traumatske ozljede mozga na aktivnosti antioksidativnih enzima u različitim moždanim strukturama štakora

U ovoj su studiji po prvi put, koliko nam je poznato, istraživane aktivnosti moždanih antioksidativnih enzima u LFP modelu ozljede mozga.

Iz rezultata naših istraživanja vidljivo je da se aktivnost SOD nije mijenjala pod utjecajem LFP ozljede niti u jednoj od testiranih regija mozga. Izostanak promjena aktivnosti SOD nakon LFP ozljede u skladu je sa sličnim rezultatima dobivenim u drugim eksperimentalnim modelima TBI (58-60). Suprotno navedenom, zabilježen je tek prolazni porast kortikalne aktivnosti SOD nakon žarišne ozljede mozga (61), ali i pad hipokampalne aktivnosti ovog enzima u CCI modelu ozljede (57). Također, u potonjem eksperimentalnom modelu TBI, pronađene su snižene razine hipokampalne aktivnosti Cu/Zn-SOD i Mn-SOD 12 do 72 sati nakon traume (272). Rezultati navedenih studija, te uključno i ovog doktorskog rada, ukazuju da je aktivnost SOD u eksperimentalnoj TBI u testiranim regijama mozga nepromijenjena ili čak snižena, iako bi bilo očekivano da bi, u uvjetima oksidativnog stresa uzrokovanog s TBI, stanična reakcija bila takva da pojača sve moguće antioksidativne mehanizme obrane, pa tako i aktivnost SOD. Ovu pretpostavku potvrđuju studije u kojima su istraživane promjene ekspresija mRNA i/ili proteina Cu/Zn-SOD i Mn-SOD u modelima TBI (61, 251), a u kojima su pokazane povećane razine ekspresije gena, odnosno proteina navedenih izoformi. Povećanje ekspresija različitih izoformi istraživanog antioksidativnog enzima, ali bez popratnog povećanja njegove aktivnosti, ukazuje na moguće važnu ulogu posttranslacijskih modifikacija koje bi mogle značajno utjecati na njihovu učinkovitost. Nadalje, brojna istraživanja ukazuju na značajan utjecaj posttraumatske produkcije ROS, ali i

RNS, na oksidativne promjene različitih proteina, uključujući i modifikacije antioksidativnih enzima (283, 284), koje mogu utjecati na njihovu aktivnost.

Rezultati ovog rada pokazali su značajna povećanja aktivnosti GSH-Px u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora s eksperimentalnom TBI u usporedbi s vrijednostima detektiranim u životinja kontrolne skupine. U ostalim testiranim moždanim strukturama nisu opažene značajne promjene u aktivnostima ovog enzima.

Do sada je objavljeno nekoliko radova u kojima su proučavane promjene aktivnosti GSH-Px u eksperimentalnim modelima TBI. Rezultati tih istraživanja su različita, te je u nekima opaženo povećanje (56, 59, 285, 286), a u drugim smanjenje (42, 64, 64, 272) aktivnosti istraživnog enzima. U studijama u kojima su proučavane promjene genske ekspresije GSH-Px dobiveni su slični rezultati, odnosno, detektirana su povećanja, ali i smanjenja genskog izražaja ovog enzima (66, 67). Nadalje, rezultati istraživanja, u kojima su korištene transgenične životinje, koje pojačano izražavaju gen za GSH-Px, bili su dvojbeni. Naime, pronađeno je da prirodno pojačana ekspresija GSH-Px može imati povoljne učinke (68, 69), ali i biti neučinkovita u modelima neuralne ozljede (70).

5.1.3. Utjecaj traumatske ozljede mozga na razine ekspresija proteina od interesa u različitim moždanim strukturama štakora

Sekundarno oštećenje mozga nakon traumatske ozljede, koje se razvija satima, danima i mjesecima nakon primarnog inzulta, posljedica je brojnih patofizioloških mehanizama.

Brojni su stanični i molekularni čimbenici koji utječu na smrt ili preživljenje neurona nakon TBI. Ozljeda mozga okidač je promjena u ekspresiji brojnih gena, odnosno proteina, koji mogu imati štetne ili protektivne učinke (156, 287-289). U dosadašnjim istraživanjima promjena genskih ili proteinskih ekspresija u eksperimentalnoj TBI, otkriveno je da se

najznačajnije mijenjaju ekspresije čimbenika povezanih s procesom upale, oksidativnim stresom, transkripcijskom regulacijom, staničnim ciklusom i toplinskim stresom (290). No, prijašnje su se studije uglavnom fokusirale na dvije regije mozga najjače zahvaćene traumom, ozljeđeni korteks i hipokampus, bez obzira što su korišteni i eksperimentalni modeli TBI koje karakteriziraju značajne promjene regija udaljenih od samog mjesta udarca (168, 169, 290-293). Također, nije posve jasan niti odnos između, s jedne strane, ekspresije pojedinih gena i regionalne disfunkcije, smrti pojedinih stanica, kao i patofiziologije, te neurobihevioralnih posljedica ozljede mozga, s druge strane (289).

Stoga je jedan od ciljeva ovog doktorskog rada bio odrediti mijenjaju li se ekspresije različitih proteina od interesa u istraživanim regijama mozga štakora 24 sata nakon LFP ozljede.

Rezultati naših istraživanja pokazali su da je razina ekspresije proinflamatornog enzima COX-2 bila značajno viša u parijetalnom i entorinalnom korteksu, hipokampusu i talamusu štakora podvrgnutih eksperimentalnoj LFP ozljedi u odnosu na razine zabilježene u životinja kontrolne skupine. Dobiveni rezultat u suglasju je s rezultatima studija (108, 133, 294, 295) u kojima je također opisana pojačana genska i/ili proteinska ekspresija istraživanog proupalnog markera u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora. Dodatno, Kunz i sur. (294) su u LFP modelu traume mozga pokazali također i povećanje ekspresije COX-2 mRNA i u peririnalnom korteksu.

U našem istraživanju po prvi puta je dokazana značajno povećana proteinska ekspresija COX-2 u talamusu i entorinalnom korteksu životinja podvrgnutih TBI. Iako je značajan mehanički utjecaj traume na oštećenje talamusa nakon LFP ozljede, u ovoj su regiji jače neurodegenerativne promjene zamijećene u kasnijem vremenskom razdoblju (3 do 7 dana) nakon TBI (276). Primarna ozljeda u dorzolateralnim jezgrama talamusa uzrokuje destrukciju neurona i oslobađanje brojnih unutarstaničnih komponenata koje mogu pokrenuti

opsežan upalni odgovor. Kako je u ovoj regiji također prisutna i infiltracija leukocita, može se raspravljati i o važnom utjecaju posttraumatske upale na odgođenu neuralnu ozljedu i smrt stanica. Detektirana povećana ekspresija COX-2 u entorinalnom korteksu u našim pokusima čini se da nije direktna posljedica lokalne smrti stanica, već je moguće rezultat pojačane glutamatergične aktivnosti.

Promjene ekspresije COX-2 nakon TBI istraživane su i u drugim eksperimentalnim modelima TBI. Većinom su dosadašnja istraživanja bila fokusirana na parijetalni korteks i hipokampus, no neke su se studije bavile ekspresijom ovog enzima i u drugim moždanim strukturama. Povećane ekspresije COX-2 mRNA i/ili proteina detektirane su u parijetalnom korteksu i hipokampusu životinja podvrgnutih difuznoj TBI (99, 116), te u ipsilateralnom korteksu i bilateralno u hipokampusu u CCI modelu ozljede (108, 296). U potonjim studijama COX-2 imunoreaktivne stanice zamijećene su i u peririnalnom i piriformnom korteksu, jezgrama amigdale, cerebelumu i dorzalnim jezgrama talamusa.

Povećana ekspresija COX-2 uzrokovana traumom mozga povezana je s lošijim funkcionalnim ishodom u eksperimentalnih životinja (99, 108, 115, 116). Sukladno navedenom, primjena specifičnih inhibitora COX-2 (npr. NS398, nimesulida, celekoksiba, DFU) u većini eksperimentalnih studija TBI rezultirala je poboljšanjem neurološkog statusa životinja (108, 297) ili povoljnijim konačnim ishodom (99, 116). No, u pojedinim studijama, njihova primjena nije imala značajnog učinka na funkcionalni status životinja (295, 298). U istraživanju Dasha i sur. (296) celekoksib je čak pogoršao motoriku životinja. U studijama u kojima su korištene genetski modificirane životinje, nedostatak genske ekspresije COX-2 smanjio je kortikalnu leziju, ali nije značajno utjecao na kognitivni status životinja nakon TBI (299, 300).

Postoje i tvrdnje o povoljnim učincima aktivnosti COX-2 nakon ozljede mozga, a temelje se na različitim nalazima. Tako, npr., povećana proizvodnja tromboksana unutar prva

2 sata nakon ozljede doprinosi hemostazi, odnosno smanjuje toksične učinke krvnih produkata u ozljeđenom tkivu mozga (108). Porast razine moždanog PGE₂, jednog od prostanoida koje sintetizira COX-2, 12 do 24 sata nakon traume mozga, može utjecati na povećanje protoka krvi, ali i smanjiti aktivaciju monocita i infiltraciju makrofaga.

Ekspresija iNOS i iNOS mRNA istraživana je u različitim eksperimentalnim modelima TBI, kao što su model ozljede padom utega (126, 134, 135), Marmarouov model difuzne TBI (128, 131), te CCI model (125). U svim navedenim studijama nađena je povećana ekspresija iNOS peri- i/ili intralezionalno. No, ovisno o modelu, postoje razlike u vremenu u kojem se iNOS najranije detektira ili u kojem je najjače izražen.

U istraživanjima u kojima je korišten LFP model ozljede mozga, povećana ekspresija iNOS mRNA detektirana je 6 i 24 sata nakon TBI u parijeto-temporalnom korteksu (132). Povišene razine iNOS proteina, odnosno iNOS pozitivne stanice detektirane su u i/ili oko ozljeđenog korteksa, u ventrikulima, te u subarahoidalnom prostoru, najranije 24 sata nakon ozljede (121, 124, 130, 132, 133, 301). Aktivnost iNOS u ozljeđenom korteksu detektirana je također i trećeg, odnosno sedmog dana po indukciji traume (121, 302).

Rezultati našeg istraživanja ukazuju da se 24 sata nakon TBI bilježe povećane razine ekspresija iNOS u hipokampusu i talamusu životinja podvrgnutih LFP ozljedi u odnosu na ekspresije izmjerene u lažno ozljeđenih životinja kontrolne skupine. U ostalim istraživanim regijama mozga nisu pronađene razlike u tkivnom sadržaju ove izoforme NOS između istraživanih eksperimentalnih skupina životinja.

Naš se nalaz nepromijenjene razine ekspresije iNOS u parijetalnom korteksu razlikuje od ranije spomenutih studija koje ukazuju na povećanu ekspresiju istraživanog markera u ozljeđenom korteksu 24 h nakon TBI (121, 123, 133). Razlika između naše i rezultata navedenih studija moguće je u pretpostavci da razine ekspresije iNOS nisu analizirane u istim

dijelovima korteksa što znači da su uzorci mogli sadržavati različite udjele oštećenog i neozlijeđenog tkiva.

U ovom doktorskom radu su prvi put, koliko znamo, praćene promjene ekspresija iNOS nakon LFP ozljede u hipokampusu, talamusu, entorinalnom korteksu i cerebelumu. Povećana ekspresija iNOS detektirana u hipokampusu i talamusu ozlijeđenih životinja ukazuje na značajan utjecaj ovog enzima, odnosno njegovog produkta, NO, u posttraumatskoj neuropatologiji ovih moždanih struktura.

Rezultati analize ekspresije I κ B α u različitim regijama mozga štakora 24 sata nakon eksperimentalne TBI dodatno ukazuju na upalni odgovor u parijetalnom korteksu ozlijeđenih životinja, u kojem je detektirana značajno manja ekspresija ovog inhibitora aktivacije NF κ B signalnog puta. Dobiveni rezultat u suglasju je s rezultatima prethodnih studija u kojima je opisana aktivacija NF κ B puta u ozlijeđenom mozgu nakon humane i eksperimentalne TBI (144, 303-306). Nonaka i sur. (144) detektirali su povećanu ekspresiju ovog transkripcijskog čimbenika u aksonima ozlijeđenih kortikalnih neurona, već 1 do 2 sata nakon LFP ozljede. Dvadeset četiri i 48 sati nakon TBI, vidljivo je bilo i značajno imunobojanje tijela neurona ozlijeđenog korteksa. Osim u neuronima, aktivacija NF κ B detektirana je i u stanicama mikroglije, aktiviranim astrocitima i endotelnim stanicama. NF κ B imunoreaktivnost u ovim stanicama perzistirala je čak do godinu dana nakon eksperimentalne TBI (144). Sullivan i sur. (307) opisali su zaštitnu ulogu NF κ B nakon eksperimentalne TBI. Koristeći genetski modificirane miševe, bez receptora za TNF α , pokazali su neuroprotektivne učinke NF κ B signalnog puta u CCI model eksperimentalne TBI.

Rezultati ovog rada pokazali su, također, da ekspresija I κ B α u ipsilateralnim hipokampusu i entorinalnom korteksu bila značajno povećana nakon TBI. Ovaj nalaz može značiti da je u navedenim regijama mozga bila izražena resinteza I κ B α ili smanjena aktivacija NF κ B 24 sata nakon LFP ozljede.

U ovom doktorskom radu pokazane su različite razine citoprotektivnog proteina HSP70 u pojedinim moždanim regijama štakora nakon TBI. Razine ekspresije HSP70 bile su značajno niže u parijetalnom korteksu i cerebelumu, a nepromijenjene u hipokampusu, talamusu i entorinalnom korteksu životinja s TBI u odnosu na vrijednosti zabilježene u životinja kontrolne skupine.

Rezultati naših istraživanja u vezi ekspresije HSP70 u parijetalnom korteksu u nesuglasju su s rezultatima istraživanja autori kojih su opisali povišene razine proteina u korteksu životinja nakon TBI (163, 170) Naši su rezultati, međutim, u skladu s istraživanjem Lowensteina i sur. (155) koji su u LFP modelu TBI pronašli indukciju gena za HSP70 u korteksu životinja s teškom, ali ne i s umjerenom ozljedom mozga. Prilikom tumačenja dobivenih rezultata važno je ukazati na neke metodološke razlike i sličnosti između naše i ostalih studija u uzimanju uzoraka parijetalnog korteksa u ozlijeđenih životinja. Naime, u ovom je radu analiziran dominantno dio korteksa koji je bio najviše izložen djelovanju udarca, a tek dijelom tkivo oko područja najjače oštećenog traumom. Rezultati imunohistološke analize HSP70 u parijetalnom korteksu također su pokazali da je ekspresija ovog proteina slabija u dijelu parijetalnog korteksa u kojem je zamijećen najveći gubitak neurona, a da je jače izražena u području koje okružuje najoštećeniji dio navedene strukture mozga. Prema morfološkim karakteristikama, ekspresija HSP70 zabilježena je uglavnom u neuronima, glija stanicama i endotelnim stanicama krvnih žila analiziranog dijela korteksa. Sukladno našem istraživanju, Kanayama i sur. (159) su u LFP modelu ozljede mozga pronašli pojačanu HSP70 imunoreaktivnost u dubokim kortikalnim strukturama, koje su smještene oko, ali ne i unutar područja nekroze u životinja podvrgnutih teškoj TBI. Autori spomenutog istraživanja pretpostavili su da je za sintezu HSP70 nužno da su neuroni ozlijeđeni, ali ipak sposobni preživjeti stresni događaj. Stoga se može zaključiti da je, u našem istraživanju pronađena, smanjena količina istraživnog stresnog proteina posljedica toga što je u

testiranim uzorcima većinom sadržano tkivo u kojem su prisutne umrle ili teško oštećene stanice, a koje nisu sposobne stvoriti dostatne količine HSP70. Dodatno, nekoliko drugih studija izvještava o indukciji HSP70 upravo u stanicama oko najjače oštećenog dijela mozga (154, 156, 157, 164). Ottens i sur. (308) navode rezultat koji je sukladan našem. Naime, autori su detektirali smanjene razine HSP70 proteina u neokorteksu ozlijeđenih životinja dva dana nakon traume u CCI modelu TBI. Bitno je napomenuti da su u navedenoj studiji analizirani uzorci neokorteksa sadržavali mjesto maksimalne lezije, ali i dio okolnog tkiva, što je istovjetno načinu uzimanja tkiva parijetalnog korteksa koji je korišten u našem istraživanju.

Dodatno, važno je napomenuti da protutijelo korišteno u ovom radu prepoznaje i konstitutivnu i inducibilnu izoformu HSP70, a većina dosadašnjih istraživanja ekspresije ovog gena, odnosno proteina, bila su fokusirana na inducibilnu izoformu. Suprotno tome, Seidberg i sur. (170) pratili su promjene ekspresija Hsc70 i Hsp70 u korteksu ljudi s TBI, te su zapazili da se u njima značajno povećava sadržaj inducibilne, ali ne i konstitutivne izoforme istraživanog stresnog proteina. Štoviše, ekspresija Hsc70 je u ozlijeđenika bila niža u odnosu na vrijednosti zabilježene u kontrolnim ispitanicima, iako nije dosegnuta razina statističke značajnosti.

Rezultati analiza ekspresije proBDNF u različitim regijama mozga štakora podvrgnutih umjerenoj TBI ukazuju na značajnu indukciju prepisivanja ovog proneurotrofina u hipokampusu i entorinalnom korteksu. Dodatno, u hipokampusima ozlijeđenih životinja zabilježena je značajnije niža ekspresija mBDNF u usporedbi s vrijednostima detektiranim u štakora pripadajuće kontrolne skupine. U ostalim istraživanim regijama nije bilo značajnih razlika među vrijednostima ekspresije proBDNF i mBDNF između štakora s TBI i lažno ozlijeđenih životinja kontrolne skupine.

Naši rezultati povećane ekspresije proBDNF u hipokampusu 24 sata nakon eksperimentalne TBI u štakora u suglasju su s objavljenim istraživanjima (164, 309) u kojima

je pronađena povećana ekspresija gena za BDNF u hipokampusu u štakora počevši od 1 sata nakon LFP ozljede, a koja je trajala sve do 3 dana po TBI. Rezultat ovog rada, nepromijenjena ekspresija proBDNF i mBDNF u parijetalnom korteksu životinja nakon LFP ozljede, u suglasju je s rezultatima Truettnera i sur. (164), ali se razlikuje od rezultata drugih istraživanja u kojima su korišteni drukčiji eksperimentalni modeli traume mozga (198, 310).

Razlike u dobivenim nalazima ekspresije BDNF u različitim eksperimentalnim modelima TBI mogu se tumačiti biomehaničkim posebnostima modela. Naime, LFP model traume mozga karakteriziran je značajnim oštećenjem dubljih slojeva korteksa, kao i bijele tvari čime su znatno poremećene aksonalne veze unutar korteksa, ali i korteksa i drugih moždanih struktura. Očuvane aksonalne veze preduvjet su za pojavu kortikalnih depolarizacija koje su povezane s indukcijom BDNF nakon ozljede mozga (311, 312).

U ovom smo radu pronašli traumom mozga uzrokovanu povećanu ekspresiju proBDNF u entorinalnom korteksu, regiji mozga koja je udaljena od mjesta primarne lezije, ali je također vrlo dobro povezana s drugim moždanim strukturama, napose s hipokampusom (183). Truettner i sur. (164) su u svom istraživanju, u kojem su koristili *in situ* hibridizaciju, pokazali pojačanu gensku ekspresiju BDNF u ovoj kortikalnoj regiji, ali u ranijim vremenskim razdobljima (2 i 6 sati) nakon ozljede. Stoga je jedna od mogućih pretpostavki da pojačana ekspresije proBDNF proteina u entorinalnom korteksu 24 sata nakon LFP ozljede nije posljedica samo njegove lokalne sinteze, već moguće i transporta iz okolnih struktura. Naime, BDNF sintetiziran u pojedinim neuronima putuje dendritima prema drugim presinaptičkim ili aksonima prema postsinaptičkim neuronima (313). Osim opisanog, anterogradnog, BDNF podliježe i retrogradnom transportu, od živčanih izdanaka prema tijelu neurona (314). Nakon sekrecije i vezanja za receptore, BDNF se internalizira endocitozom, bilo u stanicu koja ga je izlučila ili u drugu, susjednu stanicu, iz koje potom može biti ponovno egzocitiran (179).

5.1.4. Utjecaj traumatske ozljede mozga na razvoj edema u različitim moždanim strukturama štakora

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da se 48 sati nakon LFP ozljede u štakora, značajan posttraumatski edem moždanog tkiva bilježi samo u pojedinim istraživanim strukturama mozga. Naime, značajan edem detektiran je u ipsi- i kontralateralnom parijetalnom korteksu, ipsilateralnom hipokampusu, te cerebelumu. Nalaz edema u ipsilateralnom parijetalnom korteksu i hipokampusu ozlijeđenih životinja u suglasju je s ranije objavljenim studijama (315, 316). Međutim, nalaz nepromijenjenog sadržaja vode u desnom hipokampusu, te edema u kontralateralnom parijetalnom korteksu i cerebelumu ozlijeđenih životinja u suprotnosti je s rezultatima prethodnih studija u kojima je pronađen edem u kontralateralnom hipokampusu, ali ne i u kontralateralnom parijetalnom korteksu i cerebelumu štakora nakon TBI (315-317).

Pretpostavljamo da su razlike u dobivenim rezultatima između naše studije i istraživanja McIntosh i sur. (315), Bareyre i sur. (316), te Clough i sur. (317) uvjetovane razlikama u metodi indukcije eksperimentalne TBI. Naime, poznato je da male razlike u mjestu kraniotomije kod LFP ozljede mogu uzrokovati različite promjene u stupnju i regionalnoj distribuciji moždanog oštećenja (318).

5.2. Učinci pioglitazona na pokazatelje moždanog oštećenja i endogene neuroprotekcije u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga

5.2.1. Učinci pioglitazona na oksidativno oštećenje lipida i proteina te aktivnosti antioksidativnih enzima u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga

Primjena pioglitazona u životinja s TBI rezultirala je smanjenim oksidativnim oštećenjem lipida i proteina u parijetalnom korteksu, te lipida u hipokampusu, 24 sata nakon ozljede. Primjena ovog agonista PPAR γ značajno je utjecala i na aktivnosti antioksidativnih enzima SOD i GSH-Px u navedenim moždanim regijama ozlijeđenih štakora.

Rezultati našeg istraživanja u svezi utjecaja primjene pioglitazona na parametre oksidativnog stresa u parijetalnom korteksu štakora s TBI razlikuju se obzirom na primjenjenu dozu lijeka. Naime, primjenom istraživanog PPAR γ agonista u nižoj dozi (1 mg/kg) značajno je smanjeno traumom mozga inducirano oksidativno oštećenje proteina i lipida navedene moždane strukture. Dodatno, tretman nižom dozom pioglitazona značajno je povećao kortikalnu aktivnost GSH-Px, dok na aktivnost SOD nije utjecao. Iz navedenog se može pretpostaviti da je antioksidativni učinak pioglitazona primjenjenog u dozi od 1 mg/kg posljedica povećanja aktivnosti antioksidativnog enzima GSH-Px.

Učinak primjene više doze pioglitazona (3 mg/kg) na oksidativne parametre u parijetalnom korteksu razlikuju se od ranije opisanih djelovanja niže doze istraživanog lijeka. Naime, pioglitazon injiciran ozlijeđenim životinjama u dozi 3 mg/kg nije značajno utjecao na kortikalnu razinu TBARS, pokazatelja oksidativnog oštećenja lipida, u odnosu na razine izmjerene u otapalom tretiranih štakora podvrgnutih TBI. Nadalje, iako je pioglitazon primjenjen u dozi 3 mg/kg snizio razinu oksidiranih proteina u parijetalnom korteksu ozlijeđenih životinja u odnosu na razinu zabilježenu u otapalom injiciranih ozlijeđenih štakora, sadržaj proteinskih karbonila je u višom dozom lijeka tretiranih životinja bio veći u odnosu na razine oksidiranih proteina u traumatiziranih, nižom dozom lijeka tretiranih životinja.

Pioglitazon primjenjen u dozi 3 mg/kg u životinja s TBI značajno je smanjio aktivnost SOD u odnosu na razine izmjerene u traumatiziranih, otapalom tretiranih štakora. Pronađeno je, također, da je aktivnost GSH-Px u životinja s traumom mozga kojima je aplicirana doza od 3 mg/kg pioglitazona bila niža od aktivnosti ovog antioksidativnog enzima u životinja kojima

je injicirana doza od 1 mg/kg istog lijeka. Lošije djelovanje istraživnog PPAR γ agonista primijenjenog u dozi od 3 mg/kg u odnosu na povoljne efekte niže doze istog lijeka u korištenom modelu TBI moguće je objasniti navedenim učincima lijeka na aktivnosti antioksidativnih enzima. Sličan rezultat, paradoksalan gubitak djelotvornosti agonista PPAR γ s povišenjem doze, već je opisan u ranijim studijama (228, 319), ali do sad nije razjašnjeno koja je farmakološka podloga tog nalaza.

Za razliku od parijetalnog korteksa, u hipokampusu nije primijećen sličan, nepovoljniji učinak više doze pioglitazona. Upravo suprotno, primjenom više doze lijeka smanjeno je oksidativno oštećenje hipokampalnih lipida, a niža doza bila je nedjelotvorna. Dodatno, istraživani lijek, primijenjen u dozi 3 mg/kg, značajno je povišio razinu aktivnosti GSH-Px ozlijeđenih životinja u odnosu na razine zabilježene u ostalim istraživanim eksperimentalnim skupinama. Pioglitazon, primijenjen u bilo kojoj istraživanoj dozi, nije utjecao na razinu oksidiranih proteina niti na aktivnost SOD u hipokampusu ozlijeđenih životinja u odnosu na vrijednosti tih parametara u traumatiziranih životinja kojimja je injicirano otapalo.

Zamijećena razlika u rezultatima dobivenim u parijetalnom korteksu i hipokampusu, a obzirom na različite primijenjene doze pioglitazona, mogu se objasniti različitim koncentracijama lijeka u tim regijama, koje bi mogle biti posljedica različitog stupnja oštećenja KMB uzrokovanog TBI. Naime, poznato je da je pioglitazon lijek koji relativno slabo prolazi KMB (320), a i da je KMB, u LFP modelu TBI u štakora, u području parijetalnog korteksa značajno oštećena (321). Stoga se može pretpostaviti da je tkivna koncentracija lijeka u parijetalnom korteksu znatno viša u odnosu na koncentracije u drugim, akutno manje oštećenim moždanim strukturama, kao što je hipokampus.

5.2.2. Učinci pioglitazona na razine ekspresija proteina od interesa u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga

Učinci pioglitazona, ali ni drugih agonista PPAR γ na ekspresiju COX-2 u eksperimentalnoj TBI, koliko znamo, do sada nisu istraživani. U ovom radu, istraživani lijek nije utjecao na sadržaj COX-2 proteina u parijetalnom korteksu i hipokampusu 24 sata nakon TBI u štakora. Prilikom tumačenja ovog rezultata važno je istaknuti da je u ranije spomenutim istraživanjima učinaka pioglitazona u drugim modelima oboljenja, odnosno oštećenja SŽS-a, navedeni lijek primjenjivan prije ili kroz duže razdoblje, odnosno višekratno nakon indukcije ozljede. Stoga se može pretpostaviti da je u našim eksperimentalnim uvjetima jednokratna doza pioglitazona, primijenjena rano, 10 minuta nakon indukcije TBI, bila nedostatna za smanjivanje ekspresije ovog upalnog markera.

U ranije objavljenim studijama istraživani su učinci pioglitazona na moždane ekspresije iNOS u različitim modelima bolesti SŽS (223, 252, 322-324). U navedenim je studijama tretman pioglitazonom značajno smanjio ekspresije iNOS u različitim moždanim strukturama ozlijeđenih životinja. Prema našim saznanjima, učinci pioglitazona na razine ekspresije iNOS dosad nisu istraživani u LFP modelu TBI. U našoj studiji nije detektirana značajna razlika u ekspresijama iNOS u parijetalnom korteksu životinja istraživanih eksperimentalnih skupina 24 sata nakon eksperimentalne TBI. Suprotno navedenom, u hipokampusu životinja s TBI kojima je pioglitazon apliciran u dozi od 3 mg/kg razina ekspresije iNOS bila je značajno niža u odnosu na vrijednost ekspresije ovog upalnog markera zabilježenu u traumatiziranih štakora tretiranih otapalom. Mehanizam smanjenja ekspresije iNOS u našoj i prethodnim studijama oštećenja SŽS-a, uzrokovanim istraživanim PPAR γ agonistom, najvjerojatnije je inhibicija transkripcije gena za iNOS, obzirom da promotor navedenog gena sadrži PPRE sekvencu (325).

U ovom istraživanju nije dokazan učinak pioglitazona na aktivaciju NF κ B signalnog puta nakon eksperimentalne TBI. Iako su u prvom dijelu ovog doktorskog rada pokazane značajne promjene ekspresije I κ B α u parijetalnom korteksu i hipokampusu ozlijeđenih

životinja, na osnovu ranijih istraživanja temporalne ekspresije NFκB u TBI (144), kao i ekspresije IκBα u drugim, srodnim modelima ozljede SŽS poput moždane ishemije (139), vjerojatnije je da je aktivacija ovog signalnog puta značajno jače izražena u ranijim vremenskim razdobljima u odnosu na 24 sata nakon TBI. Za pretpostaviti je da bi se u vrlo ranim vremenskim intervalima nakon ozljede mogao bolje procijeniti učinak primjene PPARγ agonista na inhibitore NFκB signalnog puta. Ova se pretpostavka treba dodatno potvrditi, ali joj u prilog govore rezultati studije Zhanga i sur. (139) koji su istraživali učinke pioglitazona na ekspresiju IκBα u mozgu štakora podvrgnutih moždanoj ishemiji. U navedenom istraživanju pioglitazon je značajno povećao ishemijom sniženu ekspresiju IκBα 6 i 12 sati nakon indukcije ozljede. Potrebno je napomenuti i činjenicu da su Zhang i sur. (139) pioglitazon primjenjivali jednokratno, u dozama od 0,5 do 2 mg/kg, što je vrlo slično našem načinu davanja ovog lijeka.

U ovom radu nije pronađen učinak testiranih doza pioglitazona na razine ekspresije HSP70 proteina u parijetalnom korteksu i hipokampusu životinja s TBI, 24 sata nakon ozljede. Dobiveni rezultat u suprotnosti je s rezultatom Yi i sur. (251) koji su opisali učinke primjene roziglitazona u CCI modelu TBI. Razlika u dobivenom rezultatu između ovog rada i navedene studije moguće je posljedica činjenice da je roziglitazon selektivan agonist PPARγ, za razliku od pioglitazona, koji svoje učinke ostvaruje i vezivanjem za PPARα receptore (338). S obzirom da je u različitim modelima ne-neuralnih bolesti (326-328), te u modelu ozljede SŽS-a (329) pokazano sa pioglitazon povećava ekspresiju HSP70 u mozgu ozlijeđenih životinja, za pretpostaviti je da se povećanje izražaja ovog neuroprotektivnog proteina na razini PPAR sustva ostvaruje dominantni na razini PPARγ.

Primjena pioglitazona u životinja podvrgnutih eksperimentalnoj TBI rezultirala je značajnim povećanjem ekspresije proBDNF u parijetalnom korteksu i mBDNF u hipokampusu u odnosu na vrijednosti zabilježene navedenim strukturama mozga ozlijeđenih

životinja kojima je injicirano otapalo. Koliko nam je poznato, u ovom je radu po prvi put istraživana direktna učinak agonista PPAR γ na ekspresiju BDNF, te je, također prvi put, zabilježeno istraživanim lijekom posredovano povećanje proBDNF, odnosno mBDNF.

Iako promotor gena za BDNF ne sadrži PPRE (330), u ranijim je studijama opisan značajan izražaj PPAR u hipokampusu, strukturi mozga u kojoj se sintetiziraju velike količine arahidonske kiseline, prekursora PG (331). Nadalje, Toyomoto i sur. (332) detektirali su značajan učinak PGD₂ i PGE₂ na indukciju sinteze BDNF u kulturi astrocita. U njihovoj studiji, još snažniji učinak na ekspresiju BDNF zabilježen je za metabolite navedenih PG, a jedan od testiranih metabolita bio je i 15-deoksi-(12,14)-PGJ₂, endogeni ligand PPAR γ (333).

5.3. Učinci enoksaparina na pokazatelje moždanog oštećenja i endogene neuroprotekcije u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga

5.3.1. Učinci enoksaparina na oksidativno oštećenja lipida i proteina te aktivnosti antioksidativnih enzima u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga

U našoj je studiji, koliko znamo, prvi put istraživano djelovanje primjene enoksaparina na oksidativno oštećenje lipida i proteina, te na razine moždane aktivnosti antioksidativnih enzima SOD i GSH-Px u modelu TBI.

Primjena enoksaparina u životinja s eksperimentalnom TBI rezultirala je smanjenjem oksidativnog oštećenja lipida i proteina hipokampusa 48 sati nakon indukcije ozljede. Korišteni heparin niske molekularne mase nije imao značajnog utjecaja na iste markere oksidativnog oštećenja u parijetalnom korteksu ozlijeđenih štakora. Također, primjena enoksaparina nije imala utjecaja na aktivnosti antioksidativnog enzima SOD niti u jednoj od istraživanih regija. Suprotno navedenom, aktivnost GSH-Px u parijetalnom korteksu životinja

s traumom, a tretiranih enoksaparinom, bila je značajno viša u odnosu na vrijednost enzima u životinja podvrgnutih LFP ozljedi, tretiranih otapalom, ali i lažno traumatiziranih životinja kontrolne skupine kojima je injicirano otapalo.

Na osnovu dobivenih rezultat za pretpostaviti je povećanje aktivnosti GSH-Px uzrokovano enoksaparinom u parijetalnom korteksu životinja s TBI nije bilo dostatno da značajno smanji oksidativno oštećenje lipida i proteina u navedenoj moždanoj strukturi. Nadalje, kako u hipokampusu nismo detektirali značajan učinak enoksaparina na razine aktivnosti SOD i GSH-Px, čini se da protektivno djelovanje ovog lijeka na hipokampalno oksidativno lipidno i proteinsko oštećenje nije posredovano analiziranim antioksidativnim enzimima.

Jedan od mogućih mehanizama enoksaparinom posredovanog neuroprotektivnog antioksidativnog djelovanja u hipokampusu je inhibicija otpuštanja iona kalcija iz unutarstaničnih skladišta. Ovaj je učinak enoksaparina prethodno pokazan u *in vitro* modelu ishemijske bolesti mozga, te je posredovan antagonizmom na receptorima za inozitol-1,4,5-trifosfat (IP3) (334). Naime, traumom inducirana aktivacija metabotropnih, s G-proteinima vezanih, receptora za ekscitatorne aminokiseline potiče djelovanje PLC. Ovaj enzim katalizira pretvorbu fosfatidilinositol-4,5-bisfosfata u DAG i IP3. Ranije studije pokazale su da su nakon traumatske ozljede aktivnost PLC i razine IP3 značajno povećane (335-337). Receptori za IP3 su ligandom regulirani kalcijски канали smješteni u membrani endoplazmatskog retikuluma. Aktivacijom IP3 receptora ioni kalcija izlaze iz endoplazmatskog retikuluma, te u citosolu može aktivirati mnoge o ionima kalcija ovisne enzime, poput protein kinaze C, fosfolipaze A2, COX, NOS i kalpaina. Povećani utok iona kalcija u mitohondrije nakon TBI uzrokuje inhibiciju lanca za prijenos elektrona, što za posljedicu može imati stvaranje ROS (338).

Stoga bi enoksaparin, inhibirajući oslobađanje iona kalcija iz unutarstaničnih rezervi, mogao suprimirati jedno od prvih događanja koja su uključena u proces početnog stvaranja ROS nakon TBI i time doprinijeti smanjenju štetnih učinaka iona kalcija na moždane strukture, uključujući hipokampus.

5.3.2. Učinci enoksaparina na razine ekspresija proteina od interesa u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga

U studijama prije ove učinci enoksaparina na razine ekspresija COX-2, iNOS, I κ B α , HSP70 i BDNF nisu opisani u modelu TBI. U našim eksperimentalnim uvjetima, primjena enoksaparina u štakora podvrgnutih LFP ozljedi, značajno je smanjila ekspresiju proupalnog enzima COX-2 u parijetalnom korteksu i hipokampusu ozlijeđenih životinja.

Različiti protuupalni učinci nefrakcioniranog heparina, ali i heparina ultra niske i niske molekularne mase, pa tako i enoksaparina, prethodno su opisani uglavnom u *in vitro* studijama (339, 340-343). Dio protuupalnih učinaka enoksaparina može biti indirektna posljedica njegovog antikoagulatnog djelovanja. Naime, enoksaparin smanjuje koagulabilnost krvi vezivanjem i olakšavanjem djelovanja antitrombina III. Aktivacijom antitrombina III enoksaparin potencira inhibiciju koagulacijskih čimbenika Xa i IIa. Čimbenik Xa ima značajne proupalne osobine, te se smatra posrednikom između procesa koagulacije i upale (344). Iz navedenog slijedi da su protuupalni učinci enoksaparina, barem djelomično, posljedica njegovog anti-Xa djelovanja.

Enoksaparin, također, smanjuje endotelnom adhezijskom molekulom, P-selektinom, posredovanu adheziju trombocita i neutrofila (345), reducira ekspresiju P-selektina i ICAM-1, te smanjuje adheziju monocita (346, 347). Dodatno, u *in vitro* pokusima, istraživani heparin niske molekularne mase smanjuje aktivaciju sustava komplementa (341), ali ovaj učinak u *in*

vivo studiji nije potvrđen (348). Navedeni lijek, *in vivo*, smanjuje aktivnost enzima mijeloperoksidaze, koja predstavlja mjeru tkivne infiltracije neutrofila (257, 347).

U ovom radu, u parijetalnom korteksu enoksaparinom tretiranih životinja s traumom mozga zabilježena je statistički značajno veća ekspresija I κ B α , u odnosu na ozlijeđene, otapalom injicirane štakore. Inhibicijsko djelovanje enoksaparina na NF κ B signalni put povećanjem ekspresije I κ B α moglo bi biti objašnjenje smanjenja ekspresije COX-2 u parijetalnom korteksu životinja nakon TBI budući aktivacija NF κ B potiče prepisivanje gena, odnosno sintezu COX-2 proteina (349). Kako je primjena enoksaparina reducirala pojačanu ekspresiju COX-2 u hipokampusu ozlijeđenih životinja, a u navedenoj strukturi nije djelovala na ekspresiju I κ B α proteina, za pretpostaviti je da je učinak korištenog heparina niske molekularne mase na proupalni COX-2 enzim posredovan i nekim drugim mehanizmima, neovisnim o I κ B α .

U *in vitro* studiji Schwartza i sur. (339) proučavani su učinci enoksaparina na upalni odgovor glija stanica. Pronađeno je da ovaj lijek smanjuje produkciju PGE₂, jednog od produkata aktivnosti COX-2, ali i inhibira stvaranje TNF α od strane glija stanica. TNF α jedan je od najvažnijih čimbenika koji povećavaju transkripciju COX-2 stimulacijom aktivacije NF κ B (350). Stoga je moguće da je enoksaparin, smanjenjem produkcije TNF α spriječio sintezu COX-2 u istraživanim moždanim strukturama ozlijeđenih životinja.

U našem istraživanju, primjena enoksaparina nije značajno utjecala na ekspresije HSP70, pro- i mBDNF u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora podvrgnutih LFP ozljedi.

Sumarno, rezultati rada ukazuju na antioksidativno i protuupalno djelovanje enoksaparina u LFP modelu TBI u štakora.

6. Zaključci

1. Osnovna patofiziološka zbivanja uključena u procese moždanog oštećenja u LFP modelu TBI u štakora karakterizirana su različitim stupnjem oksidativnog oštećenja, upalnog odgovora i endogene neuroprotekcije u pojedinim moždanim strukturama.
2. Parijetalni korteks i hipokampus najjače su oksidativno i upalno oštećene moždane strukture nakon eksperimentalne traume mozga u štakora.
3. U ostalim moždanim strukturama štakora (talamusu, entorinalnom korteksu, cerebelumu) bilježe se promjene samo pojedinih proupalnih i endogenih neuroprotektivnih proteina nakon TBI.
4. Pioglitazon i enoksaparin djeluju neuroprotektivno, te smanjuju ili antagoniziraju pojedine stanične i molekularne mehanizme koji su uključeni u procese oštećenja mozga u LFP modelu traume mozga u štakora..

7. Literatura

1. Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien)* 2006;148(3):255-68.
2. International Brain Injury Association (2011), <http://www.internationalbrain.org>>. Pristupljeno 20. svibnja 2011.
3. Thornhill S, Teasdale GM, Murray GD, McEwen J, Roy CW, Penny KI. Disability in young people and adults one year after head injury: prospective cohort study. *BMJ* 2000;320:1631-5.
4. Polinder S, Meerding WJ, van Baar ME, Toet H, Mulder S, van Beeck EF; EUROCOST Reference Group. Cost estimation of injury-related hospital admissions in 10 European countries. *J Trauma* 2005;59:1283-91.
5. Centers for Disease Control and Prevention (2011), <http://www.cdc.gov/traumaticbraininjury/>. Pristupljeno 20. svibnja 2011.
6. Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J Head Trauma Rehabil* 2006;21(5):375-8.
7. Harrison-Felix C, Whiteneck G, DeVivo M.J, Hammond FM, Jha A. Causes of death following 1 year postinjury among individuals with traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil* 2006;21:22-33.
8. Brown AW, Leibson CL, Malec JF, Perkins PK, Diehl NN, Larson DR. Long-term survival after traumatic brain injury: a population-based analysis. *NeuroRehabilitation* 2004;19:37-43.
9. Silver JM, McAllister TW, Arciniegas DB. Depression and cognitive complaints following mild traumatic brain injury. *Am J Psychiatry* 2009;166(6):653-61.
10. Zink BJ. Traumatic brain injury outcome: concepts for emergency care. 2001; *Ann Emerg Med* 37(3):318-32.
11. Jang SH. Review of motor recovery in patients with traumatic brain injury. *NeuroRehabilitation* 2009; 24(4):349-53.
12. Vaishnavi S, Rao V, Fann JR. Neuropsychiatric problems after traumatic brain injury: unraveling the silent epidemic. *Psychosomatics* 2009;50(3):198-205.
13. Selassie AW, Zaloshnja E, Langlois JA, Miller T, Jones P, Steiner C. Incidence of long-term disability following traumatic brain injury hospitalization, United States, 2003. *J Head Trauma Rehabil* 2008;23(2):123-31.
14. Catania A, Lonati C, Sordi A, Gatti S. Detrimental consequences of brain injury on peripheral cells. *Brain Behav Immun* 2009;23(7):877-84.
15. Helmy A, Vizcaychipi M, Gupta AK. Traumatic brain injury: intensive care management. *Br J Anaesth* 2007;99: 32-42.

16. Morales DM, Marklund N, Lebold D i sur. Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? *Neuroscience* 2005;136(4):971-89.
17. Saatman KE, Duhaime AC, Bullock R, Maas AI, Valadka A, Manley GT. Workshop Scientific Team and Advisory Panel Members. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *J Neurotrauma* 2008;25(7):719-38.
18. Smith DH, Meaney DF, Shull WH. Diffuse axonal injury in head trauma. *J Head Trauma Rehabil* 2003;18(4):307-16.
19. de la Plata CM, Ardelean A, Koovakkattu D i sur. Magnetic resonance imaging of diffuse axonal injury: quantitative assessment of white matter lesion volume. *J Neurotrauma* 2007;24(4):591-8.
20. Levine B, Fujiwara E, O'Connor C i sur. In vivo characterization of traumatic brain injury neuropathology with structural and functional neuroimaging. *J Neurotrauma* 2006;23(10):1396-411.
21. Farkas O, Povlishock JT. Cellular and subcellular change evoked by diffuse traumatic brain injury: a complex web of change extending far beyond focal damage. *Prog Brain Res* 2007;161:43-59.
22. Ding K, Marquez de la Plata C, Wang JY, Mumphrey M i sur. Cerebral atrophy after traumatic white matter injury: correlation with acute neuroimaging and outcome. *J Neurotrauma* 2008;25(12):1433-40.
23. Ray SK, Dixon CE, Banik NL. Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Histol Histopathol* 2002;17(4):1137-52.
24. Kawamata T, Katayama Y, Hovda DA, Yoshino A, Becker DP. Lactate accumulation following concussive brain injury: the role of ionic fluxes induced by excitatory amino acids. *Brain Res* 1995;674(2):196-204.
25. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience* 2004;129(4):1021102-9.
26. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(6):657-68.
27. Lewén A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma* 2000;17(10):871-90.
28. Liou AK, Clark RS, Henshall DC, Yin XM, Chen J. To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Prog Neurobiol* 2003;69(2):103-42.
29. Langham J, Goldfrad C, Teasdale G, Shaw D, Rowan K. Calcium channel blockers for acute traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;(4):CD000565.

30. Ghirnikar RS, Lee YL, Eng LF. Inflammation in traumatic brain injury: role of cytokines and chemokines. *Neurochem Res* 1998;23(3):329-40.
31. Park E, Bell JD, Baker AJ. Traumatic brain injury: can the consequences be stopped? *CMAJ* 2008;178(9):1163-70.
32. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 1954;119(3097):623-6.
33. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244(22):6049-55.
34. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006;97(6):1634-58.
35. Kontos HA, Povlishock JT. Oxygen radicals in brain injury. *Cent Nerv Syst Trauma* 1986;3(4):257-63.
36. Kontos HA, Wei EP. Superoxide production in experimental brain injury. *J Neurosurg* 1986;64(5):803-7.
37. Farooqui AA, Horrocks LA. Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly. *Neuroscientist* 2006;12(3):245-60.
38. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994;344(8924):721-4.
39. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899:191-208.
40. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 2002;32(9):790-6.
41. Greenacre SA, Ischiropoulos H. Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res* 2001;34(6):541-81.
42. Ansari M, Roberts KN, Scheff SW. A time course of contusion-induced oxidative stress and synaptic proteins in cortex in a rat model of TBI. *J Neurotrauma* 2008;25(5):513-26.
43. Petronilho F, Feier G, de Souza B i sur. Oxidative Stress in Brain According to Traumatic Brain Injury Intensity. *J Surg Res* 2010;164(2):316-20.
44. Jackson RM, Parish G, Helton ES. Peroxynitrite modulates MnSOD gene expression in lung epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 1998;25(4-5):463-72.
45. Wendt S, Schlattner U, Wallimann T. Differential effects of peroxynitrite on human mitochondrial creatine kinase isoenzymes. Inactivation, octamer destabilization, and identification of involved residues. *J Biol Chem* 2003;278(2):1125-30.

46. Alvarez B, Demicheli V, Durán R i sur. Inactivation of human Cu, Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidiny radical. *Free Radic Biol Med* 2004;37(6):813-22.
47. Tangpong J, Cole MP, Sultana R i sur. Adriamycin-mediated nitration of manganese superoxide dismutase in the central nervous system: insight into the mechanism of chemobrain. *J Neurochem* 2007;100(1):191-201.
48. Reed TT, Owen J, Pierce WM, Sebastian A, Sullivan PG, Butterfield DA. Proteomic identification of nitrated brain proteins in traumatic brain-injured rats treated postinjury with gamma-glutamylcysteine ethyl ester: insights into the role of elevation of glutathione as a potential therapeutic strategy for traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 2009;87(2):408-17.
49. Chen J, Jin K, Chen M, Pei W i sur. Early detection of DNA strand breaks in the brain after transient focal ischemia: implications for the role of DNA damage in apoptosis and neuronal cell death. *J Neurochem* 1997;69(1):232-45.
50. Johnson EA, Svetlov SI, Wang KK, Hayes RL, Pineda JA. Cell-specific DNA fragmentation may be attenuated by a survivin-dependent mechanism after traumatic brain injury in rats. *Exp Brain Res* 2005;167(1):17-26.
51. Facheris M, Beretta S, Ferrarese C. Peripheral markers of oxidative stress and excitotoxicity in neurodegenerative disorders: tools for diagnosis and therapy? *J Alzheimers Dis* 2004;6(2):177-84.
52. Markesbery WR, Lovell MA. DNA oxidation in Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal* 2006;8(11-12):2039-45.
53. Lewén A, Sugawara T, Gasche Y, Fujimura M, Chan PH. Oxidative cellular damage and the reduction of APE/Ref-1 expression after experimental traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 2001;8(3):380-90.
54. Mendez DR, Cherian L, Moore N, Arora T, Liu PK, Robertson CS. Oxidative DNA lesions in a rodent model of traumatic brain injury. *J Trauma* 2004;56(6):1235-40.
55. Pedersen MO, Larsen A, Pedersen DS, Stoltenberg M, Penkowa M. Metallic gold reduces TNFalpha expression, oxidative DNA damage and pro-apoptotic signals after experimental brain injury. *Brain Res* 2009;1271:103-13.
56. DeKosky ST, Abrahamson EE, Taffe KM, Dixon CE, Kochanek PM, Ikonomic MD. Effects of post-injury hypothermia and nerve growth factor infusion on antioxidant enzyme activity in the rat: implications for clinical therapies. *J Neurochem* 2004;90(4):998-1004.
57. DeKosky ST, Taffe KM, Abrahamson EE, Dixon CE, Kochanek PM, Ikonomic MD. Time course analysis of hippocampal nerve growth factor and antioxidant enzyme activity following lateral controlled cortical impact brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 2004;21(5):491-500.

58. Shohami E, Shapira Y, Rosenthal J, Reches A. Superoxide dismutase activity is not affected by closed head injury in rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1991;2(1-2):103-9.
59. Ozdemir D, Uysal N, Gonenc S i sur. Effect of melatonin on brain oxidative damage induced by traumatic brain injury in immature rats. *Physiol Res* 2005;54(6):631-7.
60. Shao C, Roberts KN, Markesbery WR, Scheff SW, Lovell MA. Oxidative stress in head trauma in aging. *Free Radic Biol Med* 2006;41(1):77-85.
61. Yunoki M, Kawauchi M, Ukita N i sur. Effects of lecithinized superoxide dismutase on traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 1997;14(10):739-46.
62. Maier CM, Chan PH. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* 2002;8(4):323-34.
63. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70(1):158-69.
64. Üstün ME, Duman A, Oğun CO, Vatansev H, Ak A. Effects of nimodipine and magnesium sulfate on endogenous antioxidant levels in brain tissue after experimental head trauma. *J Neurosurg Anesthesiol* 2001;13(3):227-32.
65. Yilmaz N, Dulger H, Kiymaz N, Yilmaz C, Gudu BO, Demir I. Activity of mannitol and hypertonic saline therapy on the oxidant and antioxidant system during the acute term after traumatic brain injury in the rats. *Brain Res* 2007;1164:132-5.
66. Hellmich HL, Garcia JM, Shimamura M i sur. Traumatic brain injury and hemorrhagic hypotension suppress neuroprotective gene expression in injured hippocampal neurons. *Anesthesiology*. 2005;102(4):806-14.
67. Shimamura M, Garcia JM, Prough DS i sur. Analysis of long-term gene expression in neurons of the hippocampal subfields following traumatic brain injury in rats. *Neuroscience* 2005;131(1):87-97.
68. Xiong Y, Shie FS, Zhang J, Lee CP, Ho YS. The protective role of cellular glutathione peroxidase against trauma-induced mitochondrial dysfunction in the mouse brain. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2004;13(3):129-37.
69. Tsuru-Aoyagi K, Potts MB, Trivedi A, Pfankuch T, Raber J, Wendland M, Claus CP, Koh SE, Ferriero D, Noble-Haeusslein LJ. Glutathione peroxidase activity modulates recovery in the injured immature brain. *Ann Neurol* 2009;65(5):540-9.
70. Potts MB, Rola R, Claus CP, Ferriero DM, Fike JR, Noble-Haeusslein LJ. Glutathione peroxidase overexpression does not rescue impaired neurogenesis in the injured immature brain. *J Neurosci Res* 2009;87(8):1848-57.
71. Schmidt OI, Heyde CE, Ertel W, Stahel PF. Closed head injury - an inflammatory disease? *Brain Res Brain Res Rev* 2005;48(2):388-99.

72. Mathew P, Graham DI, Bullock R, Maxwell W, McCulloch J, Teasdale G. Focal brain injury: histological evidence of delayed inflammatory response in a new rodent model of focal cortical injury. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1994;60:428-30.
73. Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol* 2008;3:99-126.
74. Shohami E, Shapira Y, Sidi A, Cotev S. Head injury induces increased prostaglandin synthesis in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987;7(1):58-63.
75. Dewitt DS, Kong DL, Lyeth BG i sur. Experimental traumatic brain injury elevates brain prostaglandin E2 and thromboxane B2 levels in rats. *J Neurotrauma* 1988;5(4):303-13.
76. Ellis EF, Police RJ, Rice LY, Grabeel M, Holt S. Increased plasma PGE₂, 6-keto-PGF₁ alpha, and 12-HETE levels following experimental concussive brain injury. *J Neurotrauma* 1989;6(1):31-7.
77. Morganti-Kossmann MC, Lenzlinger PM, Hans V i sur. Production of cytokines following brain injury: beneficial and deleterious for the damaged tissue. *Mol Psychiatry* 1997;2(2):133-6.
78. Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. *Neuroimmunomodulation* 1998;5(3-4):143-59.
79. Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999;10(2):119-30.
80. Bellander BM, van Holst H, Fredman P, Svensson M. Activation of the complement cascade and the increase clusterin in the brain following a cortical contusion in the adult rat. *J Neurosurg* 1996;85:468-75.
81. Stahel PF, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T. The role of the complement system in traumatic brain injury. *Brain Res Brain Res Rev* 1998;27(3):243-56.
82. Brown KA. Factors modifying the migration of lymphocytes across the blood-brain barrier. *Int Immunopharmacol*. 2001;1(12):2043-62.
83. Carlos TM, Clark RS, Franicola-Higgins D, Schiding JK, Kochanek PM. Expression of endothelial adhesion molecules and recruitment of neutrophils after traumatic brain injury in rats. *J Leukoc Biol* 1997;61(3):279-85.
84. Chodobski A, Chung I, Koźniewska E i sur. Early neutrophilic expression of vascular endothelial growth factor after traumatic brain injury. *Neuroscience* 2003;122(4):853-67.
85. Clausen F, Lorant T, Lewén A, Hillered L. T lymphocyte trafficking: a novel target for neuroprotection in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007;24(8):1295-307.
86. Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci* 1995;18(2):83-8.

87. Morgan BP, Gasque P. Expression of complement in the brain: role in health and disease. *Immunol Today* 1996;17(10):461-6.
88. Asesnio VC, Campbell IL. Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. *Trends Neurosci* 1999;22:504-12.
89. Barnum SR. Complement in central nervous system inflammation. *Immunol Res* 2002;26:7-13.
90. Ransohoff RM. Chemokines in neurological trauma models. *Ann N Y Acad Sci* 2002;961:346-9.
91. Ransohoff RM. The chemokine system in neuroinflammation: an update. *J Infect Dis* 2002;186 Suppl 2:S152-6.
92. Lenzlinger PM, Morganti-Kossmann MC, Laurer HL, McIntosh TK. The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Mol Neurobiol* 2001;24(1-3):169-81.
93. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care* 2002;8(2):101-5.
94. Correale J, Villa A. The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *J Neurol* 2004;251(11):1304-16.
95. Dhillon HS, Donaldson D, Dempsey RJ, Prasad MR. Regional levels of free fatty acids and Evans blue extravasation after experimental brain injury. *J Neurotrauma* 1994;11(4):405-15.
96. Homayoun P, Rodriguez de Turco EB, Parkins NE i sur. Delayed phospholipid degradation in rat brain after traumatic brain injury. *J Neurochem* 1997;69(1):199-205.
97. O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett* 1993;330(2):156-60.
98. Yermakova AV, Rollins J, Callahan LM, Rogers J, O'Banion MK. Cyclooxygenase-1 in human Alzheimer and control brain: quantitative analysis of expression by microglia and CA3 hippocampal neurons. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58(11):1135-46.
99. Cernak I, O'Connor C, Vink R. Activation of cyclo-oxygenase-2 contributes to motor and cognitive dysfunction following diffuse traumatic brain injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001;28(11):922-5.
100. Saper CB, Breder CD. Endogenous pyrogens in the CNS: role in the febrile response. *Prog Brain Res* 1992;93:419-28.
101. Nishizaki T, Nomura T, Matsuoka T, Tsujishita Y. Arachidonic acid as a messenger for the expression of long-term potentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;19;254(2):446-9.

102. Feng L, Sun W, Xia Y i sur. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch Biochem Biophys* 1993;307(2):36136-8.
103. Seibert K, Zhang Y, Leahy K i sur. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(25):12013-7.
104. Tsubokura S, Watanabe Y, Ehara H i sur. Localization of prostaglandin endoperoxide synthase in neurons and glia in monkey brain. *Brain Res* 1991;543(1):15-24.
105. Breder CD, Smith WL, Raz A i sur. Distribution and characterization of cyclooxygenase immunoreactivity in the ovine brain. *J Comp Neurol* 1992;322(3):409-38.
106. Li SR, Wu KK, Anggard E, Ferns G. Localization of prostaglandin G/H synthase gene expression in rat brain by in situ hybridization. *Biol Signals* 1993;2(2):77-83.
107. Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, Isakson P. COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(6):2317-21.
108. Strauss KI, Barbe MF, Marshall RM, Raghupathi R, Mehta S, Narayan RK. Prolonged cyclooxygenase-2 induction in neurons and glia following traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 2000;17(8):695-711.
109. Adams J, Collaço-Moraes Y, de Belleruche J. Cyclooxygenase-2 induction in cerebral cortex: an intracellular response to synaptic excitation. *J Neurochem* 1996;66(1):6-13.
110. Hewett S, Uliasz T, Vidwans A, Hewett J. Cyclooxygenase-2 contributes to N-methyl-D-aspartate-mediated neuronal cell death in primary cortical cell culture. *J Pharm Exp Ther* 2000;293(2):417-25.
111. Strauss KI, Marini AM. Cyclooxygenase-2 inhibition protects cultured cerebellar granule neurons from glutamate-mediated cell death. *J Neurotrauma* 2002;19(5):627-38.
112. Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63(9):901-10.
113. Tzeng SF, Hsiao HY, Mak OT. Prostaglandins and cyclooxygenases in glial cells during brain inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4(3):335-40.
114. Nadjar A, Tridon V, May MJ i sur. NFkappaB activates in vivo the synthesis of inducible Cox-2 in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25(8):1047-59.
115. Gopez JJ, Yue H, Vasudevan R i sur. Cyclooxygenase-2-specific inhibitor improves functional outcomes, provides neuroprotection, and reduces inflammation in a rat model of traumatic brain injury. *Neurosurgery* 2005;56(3):590-604.
116. Cernak I, O'Connor C, Vink R. Inhibition of cyclooxygenase 2 by nimesulide improves cognitive outcome more than motor outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. *Exp Brain Res* 2002;147:193-9.

117. Ogorochi T, Narumiya S, Mizuno N, Yamashita K, Miyazaki H, Hayaishi O. Regional distribution of prostaglandins D2, E2, and F2 alpha and related enzymes in postmortem human brain. *J Neurochem* 1984;43(1):71-82.
118. Abramovitz M, Adam M, Boie Y i sur. The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochim Biophys Acta* 2000;1483(2):285-93.
119. Scheff SW, Price DA, Hicks RR, Baldwin SA, Robinson S, Brackney C. Synaptogenesis in the hippocampal CA1 field following traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2005;22(7):719-32.
120. Cherian L, Hlatky R, Robertson CS. Nitric oxide in traumatic brain injury. *Brain Pathol* 2004;14(2):195-201.
121. Wada K, Chatzipanteli K, Kraydieh S, Busto R, Dietrich WD. Inducible nitric oxide synthase expression after traumatic brain injury and neuroprotection with aminoguanidine treatment in rats. *Neurosurgery* 1998;43(6):1427-36.
122. Wada K, Chatzipanteli K, Busto R, Dietrich WD. Effects of L-NAME and 7-NI on NOS catalytic activity and behavioral outcome after traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 1999;16(3):203-12.
123. Tuzgen S, Tanriover N, Uzan M i sur. Nitric oxide levels in rat cortex, hippocampus, cerebellum, and brainstem after impact acceleration head injury. *Neurol Res* 2003;25(1):31-4.
124. D'Ambrosio R, Maris DO, Grady MS, Winn HR, Janigro D. Selective loss of hippocampal long-term potentiation, but not depression, following fluid percussion injury. *Brain Res* 1998;786(1-2):64-79.
125. Sinz EH, Kochanek PM, Dixon CE i sur. Inducible nitric oxide synthase is an endogenous neuroprotectant after traumatic brain injury in rats and mice. *J Clin Invest* 1999;104(5):647-56.
126. Gahm C, Holmin S, Mathiesen T. Temporal profiles and cellular sources of three nitric oxide synthase isoforms in the brain after experimental contusion. *Neurosurgery* 2000;46(1):169-77.
127. Orihara Y, Ikematsu K, Tsuda R, Nakasono I. Induction of nitric oxide synthase by traumatic brain injury. *Forensic Sci Int* 2001;123(2-3):142-9.
128. Petrov T, Underwood BD, Braun B, Alousi SS, Rafols JA. Upregulation of iNOS expression and phosphorylation of eIF-2alpha are paralleled by suppression of protein synthesis in rat hypothalamus in a closed head trauma model. *J Neurotrauma* 2001;18(8):799-812.
129. Gahm C, Holmin S, Mathiesen T. Nitric oxide synthase expression after human brain contusion. *Neurosurgery* 2002;50(6):1319-26.

130. Lu J, Moochhala S, Shirhan M i sur. Neuroprotection by aminoguanidine after lateral fluid-percussive brain injury in rats: a combined magnetic resonance imaging, histopathologic and functional study. *Neuropharmacology* 2003;44(2):253-63.
131. Steiner J, Rafols D, Park HK, Katar MS, Rafols JA, Petrov T. Attenuation of iNOS mRNA exacerbates hypoperfusion and upregulates endothelin-1 expression in hippocampus and cortex after brain trauma. *Nitric Oxide* 2004;10(3):162-9.
132. Jafarian-Tehrani M, Louin G, Royo NC i sur. 1400W, a potent selective inducible NOS inhibitor, improves histopathological outcome following traumatic brain injury in rats. *Nitric Oxide* 2005;12(2):61-9.
133. Moochhala SM, Lu J, Xing MC i sur. Mercaptoethylguanidine inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expressions induced in rats after fluid-percussion brain injury. *J Trauma* 2005;59(2):450-7.
134. Rooker S, Jander S, Van Reempts J i sur. Spatiotemporal pattern of neuroinflammation after impact-acceleration closed head injury in the rat. *Mediators Inflamm* 2006;2006(1):90123.
135. Hüttemann M, Lee I, Kreipke CW, Petrov T. Suppression of the inducible form of nitric oxide synthase prior to traumatic brain injury improves cytochrome c oxidase activity and normalizes cellular energy levels. *Neuroscience* 2008;151(1):148-54.
136. O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 1997;20(6):252-8.
137. Małek R, Borowicz KK, Jargiello M, Czuczwar SJ. Role of nuclear factor kB in the central nervous system. *Pharmacol Rep* 2007;59(1):25-33.
138. Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ* 2006;13(5):852-60.
139. Zhang HL, Xu M, Wei C i sur. Neuroprotective effects of pioglitazone in a rat model of permanent focal cerebral ischemia are associated with peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated suppression of nuclear factor-κB signaling pathway. *Neuroscience* 2011;176:381-95.
140. Grilli M, Memo M. Nuclear factor-kappaB/Rel proteins: a point of convergence of signalling pathways relevant in neuronal function and dysfunction. *Biochem Pharmacol* 1999;57(1):1-7.
141. Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB i sur. Global ischemia activates nuclear factor-kappa B in forebrain neurons of rats. *Stroke* 1997;28(5):1073-80.
142. Nurmi A, Lindsberg PJ, Koistinaho M, Zhang W, Juettler E, Karjalainen-Lindsberg ML, Weih F, Frank N, Schwaninger M, Koistinaho J. Nuclear factor-kappaB contributes to infarction after permanent focal ischemia. *Stroke* 2004;35(4):987-91.
143. Lerner-Natoli M, Montpied P, Rousset MC, Bockaert J, Rondouin G. Sequential expression of surface antigens and transcription factor NFkappaB by hippocampal cells in excitotoxicity and experimental epilepsy. *Epilepsy Res* 2000;41(2):141-54.

144. Nonaka M, Chen XH, Pierce JE i sur. Prolonged activation of NF-kappaB following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 1999;16(11):1023-34.
145. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962;18:571-3.
146. Nollen EA, Brunsting JF, Roelofsen H, Weber LA, Kampinga HH. In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol Cell Biol* 1999;19(3):2069-79.
147. Mosser DD, Caron AW, Bourget L i sur. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000;20(19):7146-59.
148. Giffard RG, Han RQ, Emery JF, Duan M, Pittet JF. Regulation of apoptotic and inflammatory cell signaling in cerebral ischemia: the complex roles of heat shock protein 70. *Anesthesiology* 2008;109(2):339-48.
149. Kettern N, Dreiseidler M, Tawo R, Höhfeld J. Chaperone-assisted degradation: multiple paths to destruction. *Biol Chem* 2010;391(5):481-9.
150. Feinstein DL, Galea E, Aquino DA, Li GC, Xu H, Reis DJ. Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitric-oxide synthase expression by decreasing NFkappaB activation. *J Biol Chem* 1996;271(30):17724-32.
151. Wong HR, Ryan M, Wispé JR. The heat shock response inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression by blocking I kappa-B degradation and NF-kappa B nuclear translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231(2):257-63.
152. Bodega G, Hernández C, Suárez I, Martín M, Fernández B. HSP70 constitutive expression in rat central nervous system from postnatal development to maturity. *J Histochem Cytochem* 2002;50(9):1161-8.
153. Brown IR, Rush S, Ivy GO. Induction of a heat shock gene at the site of tissue injury in the rat brain. *Neuron* 1989;2(6):1559-64.
154. Tanno H, Nockels RP, Pitts LH, Noble LJ. Immunolocalization of heat shock protein after fluid percussive brain injury and relationship to breakdown of the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993;13(1):116-24.
155. Lowenstein DH, Gwinn RP, Seren MS, Simon RP, McIntosh TK. Increased expression of mRNA encoding calbindin-D28K, the glucose-regulated proteins, or the 72 kDa heat-shock protein in three models of acute CNS injury. *Brain Res Mol Brain Res* 1994;22(1-4):299-308.
156. Raghupathi R, Welsh FA, Lowenstein DH, Gennarelli TA, McIntosh TK. Regional induction of c-fos and heat shock protein-72 mRNA following fluid-percussion brain injury in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15(3):467-73.
157. Mikawa S, Sharp FR, Kamii H, Kinouchi H, Epstein CJ, Chan PK. Expression of c-fos and hsp70 mRNA after traumatic brain injury in transgenic mice overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Brain Res Mol Brain Res* 1995;33(2):288-94.

158. Fukuda K, Aihara N, Sagar SM i sur. Purkinje cell vulnerability to mild traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1996;13(5):255-66.
159. Kanayama G, Takeda M, Morihara T i sur. Temporal and regional profiles of cytoskeletal protein accumulation in the rat brain following traumatic brain injury. *Psychiatry Clin Neurosci* 1997;51(3):157-65.
160. Dunn-Meynell AA, Levin BE. Histological markers of neuronal, axonal and astrocytic changes after lateral rigid impact traumatic brain injury. *Brain Res* 1997;761(1):25-41.
161. Chen M, Clark RS, Kochanek PM i sur. 72-kDa heat shock protein and mRNA expression after controlled cortical impact injury with hypoxemia in rats. *J Neurotrauma* 1998;15(3):171-81.
162. Dutcher SA, Underwood BD, Michael DB, Diaz FG, Walker PD. Heat-shock protein 72 expression in excitotoxic versus penetrating injuries of the rodent cerebral cortex. *J Neurotrauma* 1998;15(6):421-32.
163. Dutcher SA, Underwood BD, Walker PD, Diaz FG, Michael DB. Patterns of heat-shock protein 70 biosynthesis following human traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1998;15(6):411-20.
164. Truettner J, Schmidt-Kastner R, Busto R i sur. Expression of brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and heat shock protein HSP70 following fluid percussion brain injury in rats. *J Neurotrauma* 1999;16(6):471-86.
165. Truettner JS, Hu B, Alonso OF, Bramlett HM, Kokame K, Dietrich WD. Subcellular stress response after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007;24(4):599-612.
166. Katano H, Masago A, Taki H, Nakatsuka M, Fuse T, Yamada K. p53-independent transient p21(WAF1/CIP1) mRNA induction in the rat brain following experimental traumatic injury. *Neuroreport* 2000;11(10):2073-8.
167. Matzilevich DA, Rall JM, Moore AN, Grill RJ, Dash PK. High-density microarray analysis of hippocampal gene expression following experimental brain injury. *J Neurosci Res* 2002;67(5):646-63.
168. Rall JM, Matzilevich DA, Dash PK. Comparative analysis of mRNA levels in the frontal cortex and the hippocampus in the basal state and in response to experimental brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2003;29(2):118-31.
169. Raghavendra Rao VL, Dhodda VK, Song G, Bowen KK, Dempsey RJ. Traumatic brain injury-induced acute gene expression changes in rat cerebral cortex identified by GeneChip analysis. *J Neurosci Res* 2003;71(2):208-19.
170. Seidberg NA, Clark RS, Zhang X i sur. Alterations in inducible 72-kDa heat shock protein and the chaperone cofactor BAG-1 in human brain after head injury. *J Neurochem* 2003;84(3):514-21.
171. Lai Y, Kochanek PM, Adelson PD, Janesko K, Ruppel RA, Clark RS. Induction of the stress response after inflicted and non-inflicted traumatic brain injury in infants and children. *J Neurotrauma* 2004;21(3):229-37.

172. Paschen W, Yatsiv I, Shoham S, Shohami E. Brain trauma induces X-box protein 1 processing indicative of activation of the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *J Neurochem* 2004;88(4):983-92.
173. Singleton RH, Povlishock JT. Identification and characterization of heterogeneous neuronal injury and death in regions of diffuse brain injury: evidence for multiple independent injury phenotypes. *J Neurosci* 2004;24(14):3543-53.
174. Michael DB, Byers DM, Irwin LN. Gene expression following traumatic brain injury in humans: analysis by microarray. *J Clin Neurosci* 2005;12(3):284-90.
175. DeGracia DJ, Kreipke CW, Kayali FM, Rafols JA. Brain endothelial HSP-70 stress response coincides with endothelial and pericyte death after brain trauma. *Neurol Res* 2007;29(4):356-61.
176. Yenari MA, Fink SL, Sun GH i sur. Gene therapy with HSP72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann Neurol* 1998;44(4):584-91.
177. Armstead WM, Hecker JG. Heat shock protein modulation of KATP and KCa channel cerebrovasodilation after brain injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289(3):H1184-90.
178. Lu B, Figurov A. Role of neurotrophins in synapse development and plasticity. *Rev Neurosci* 1997;8(1):1-12.
179. Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol* 2003;69(5):341-74.
180. Hyman C, Hofer M, Barde YA i sur. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 1991;350(6315):230-2.
181. Knüsel B, Winslow JW, Rosenthal A i sur. Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(3):961-5.
182. Lindholm D, Dechant G, Heisenberg CP, Thoenen H. Brain-derived neurotrophic factor is a survival factor for cultured rat cerebellar granule neurons and protects them against glutamate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 1993;5(11):1455-64.
183. Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci* 1997;17(7):2295-313.
184. Blöchl A, Thoenen H. Characterization of nerve growth factor (NGF) release from hippocampal neurons: evidence for a constitutive and an unconventional sodium-dependent regulated pathway. *Eur J Neurosci* 1995;7(6):1220-8.
185. Blöchl A, Thoenen H. Localization of cellular storage compartments and sites of constitutive and activity-dependent release of nerve growth factor (NGF) in primary cultures of hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 1996;7(3):173-90.

186. Goodman LJ, Valverde J, Lim F i sur. Regulated release and polarized localization of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 1996;7(3):222-38.
187. Mowla SJ, Pareek S, Farhadi HF i sur. Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J Neurosci* 1999;19(6):2069-80.
188. Bhattacharyya A, Watson FL, Bradlee TA, Pomeroy SL, Stiles CD, Segal RA. Trk receptors function as rapid retrograde signal carriers in the adult nervous system. *J Neurosci* 1997;17(18):7007-16.
189. Mufson EJ, Kroin JS, Sendera TJ, Sobrevela T. Distribution and retrograde transport of trophic factors in the central nervous system: functional implications for the treatment of neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol* 1999;57(4):451-84.
190. Watson FL, Heerssen HM, Moheban DB i sur. Rapid nuclear responses to target-derived neurotrophins require retrograde transport of ligand-receptor complex. *J Neurosci* 1999;19(18):7889-900.
191. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001;294(5548):1945-8.
192. Pang PT, Teng HK, Zaitsev E i sur. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 2004;306(5695):487-91.
193. Kohara K, Kitamura A, Morishima M, Tsumoto T. Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science* 2001;291(5512):2419-23.
194. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;361(1473):1545-64.
195. Lau AG, Irier HA, Gu J i sur. Distinct 3'UTRs differentially regulate activity-dependent translation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(36):15945-50.
196. Béjot Y, Prigent-Tessier A, Cachia C i sur. Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats. *Neurochem Int* 2011;58(1):102-11.
197. Nakamura M, Bregman BS. Differences in neurotrophic factor gene expression profiles between neonate and adult rat spinal cord after injury. *Exp Neurol* 2001;169(2):407-15.
198. Oyesiku NM, Evans CO, Houston S i sur. Regional changes in the expression of neurotrophic factors and their receptors following acute traumatic brain injury in the adult rat brain. *Brain Res* 1999;833(2):161-72.
199. Wu A, Molteni R, Ying Z, Gomez-Pinilla F. A saturated-fat diet aggravates the outcome of traumatic brain injury on hippocampal plasticity and cognitive function by reducing brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 2003;119(2):365-75.

200. Kazanis I, Giannakopoulou M, Philippidis H, Stylianopoulou F. Alterations in IGF-I, BDNF and NT-3 levels following experimental brain trauma and the effect of IGF-I administration. *Exp Neurol* 2004;186(2):221-34.
201. Griesbach GS, Hovda DA, Gomez-Pinilla F. Exercise-induced improvement in cognitive performance after traumatic brain injury in rats is dependent on BDNF activation. *Brain Res* 2009;1288:105-15.
202. Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 2004;21(10):1457-67.
203. Chiaretti A, Piastra M, Polidori G i sur. Correlation between neurotrophic factor expression and outcome of children with severe traumatic brain injury. *Intensive Care Med* 2003;29(8):1329-38.
204. Chiaretti A, Antonelli A, Riccardi R i sur. Nerve growth factor expression correlates with severity and outcome of traumatic brain injury in children. *Eur J Paediatr Neurol* 2008;12(3):195-204.
205. Dail WG, Feeney DM, Murray HM, Linn RT, Boyeson MG. Responses to cortical injury: II. Widespread depression of the activity of an enzyme in cortex remote from a focal injury. *Brain Res* 1981;211(1):79-89.
206. Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res* 1981;211(1):67-77.
207. Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods* 1991;39(3):253-62.
208. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg* 1994;80(2):291-300.
209. Cernak I, Vink R, Zapple DN i sur. The pathobiology of moderate diffuse traumatic brain injury as identified using a new experimental model of injury in rats. *Neurobiol Dis* 2004;17(1):29-43.
210. McIntosh TK, Vink R, Noble L i sur. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience* 1989;28(1):233-44.
211. Thompson HJ, Lifshitz J, Marklund N i sur. Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. *J Neurotrauma* 2005;22(1):42-75.
212. Yaghmai A, Povlishock J. Traumatically induced reactive change as visualized through the use of monoclonal antibodies targeted to neurofilament subunits. *J Neuropathol Exp Neurol* 1992;51(2):158-76.
213. Saatman KE, Graham DI, McIntosh TK. The neuronal cytoskeleton is at risk after mild and moderate brain injury. *J Neurotrauma* 1998;15(12):1047-58.

214. Carbonell WS, Maris DO, McCall T, Grady MS. Adaptation of the fluid percussion injury model to the mouse. *J Neurotrauma* 1998;15(3):217-29.
215. Carbonell WS, Grady MS. Regional and temporal characterization of neuronal, glial, and axonal response after traumatic brain injury in the mouse. *Acta Neuropathol* 1999;98(4):396-406.
216. Timmons SD. Current trends in neurotrauma care. *Crit Care Med* 2010;38(9 Suppl):S431-44.
217. Vink R, Nimmo AJ. Multifunctional drugs for head injury. *Neurotherapeutics* 2009;6(1):28-42.
218. Jain KK. Neuroprotection in traumatic brain injury. *Drug Discov Today* 2008;13(23-24):1082-9.
219. Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* 2005;51(2):85-94.
220. Gervois P, Chopin-Delannoy S, Fadel A i sur. Fibrates increase human REV-ERBalpha expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. *Mol Endocrinol* 1999;13(3):400-9.
221. Tan NS, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Multiple expression control mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptors and their target genes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;93(2-5):99-105.
222. Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPARgamma. *Cell* 2005;123(6):993-9.
223. Dehmer T, Heneka MT, Sastre M, Dichgans J, Schulz JB. Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson's disease correlates with I kappa B alpha induction and block of NF kappa B and iNOS activation. *J Neurochem* 2004;88(2):494-501.
224. Barbiero JK, Santiago RM, Lima MM, Ariza D, Morais LH, Andreatini R, Vital MA. Acute but not chronic administration of pioglitazone promoted behavioral and neurochemical protective effects in the MPTP model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2011;216(1):186-92.
225. Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L i sur. Acute treatment with the PPARgamma agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1-42 levels in APPV717I transgenic mice. *Brain* 2005;128(Pt 6):1442-53.
226. Collino M, Aragno M, Mastrocola R i sur. Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR-gamma agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol* 2006;530(1-2):70-80.
227. Luo Y, Yin W, Signore AP i sur. Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *J Neurochem* 2006;97(2):435-48.

228. Gamboa J, Blankenship DA, Niemi JP i sur. Extension of the neuroprotective time window for thiazolidinediones in ischemic stroke is dependent on time of reperfusion. *Neuroscience* 2010;170(3):846-57.
229. McTigue DM, Tripathi R, Wei P, Lash AT. The PPAR gamma agonist Pioglitazone improves anatomical and locomotor recovery after rodent spinal cord injury. *Exp Neurol* 2007;205(2):396-406.
230. Park SW, Yi JH, Miranpuri G i sur. Thiazolidinedione class of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists prevents neuronal damage, motor dysfunction, myelin loss, neuropathic pain, and inflammation after spinal cord injury in adult rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320(3):1002-12.
231. Zhang Q, Hu W, Meng B, Tang T. PPARgamma agonist rosiglitazone is neuroprotective after traumatic spinal cord injury via anti-inflammatory in adult rats. *Neurol Res* 2010; 32(8):852-9.
232. Feinstein DL, Galea E, Gavrilyuk V i sur. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists prevent experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* 2002;51(6):694-702.
233. Abdallah DM. Anticonvulsant potential of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist pioglitazone in pentylenetetrazole-induced acute seizures and kindling in mice. *Brain Res* 2010;1351:246-53.
234. Bordet R, Ouk T, Petrault O i sur. PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans* 2006;34(Pt 6):1341-6.
235. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391(6662):79-82.
236. Petrova TV, Akama KT, Van Eldik LJ. Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(8):4668-73.
237. Bernardo A, Minghetti L. PPAR-gamma agonists as regulators of microglial activation and brain inflammation. *Curr Pharm Des* 2006;12(1):93-109.
238. Sundararajan S, Jiang Q, Heneka M, Landreth G. PPARgamma as a therapeutic target in central nervous system diseases. *Neurochem Int* 2006;49(2):136-44.
239. Kapadia R, Yi JH, Vemuganti R. Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Front Biosci* 2008;13:1813-26.
240. McTigue DM. Potential Therapeutic Targets for PPARgamma after Spinal Cord Injury. *PPAR Res* 2008;2008:517162.
241. Ji H, Wang H, Zhang F, Li X, Xiang L, Aiguo S. PPAR γ agonist pioglitazone inhibits microglia inflammation by blocking p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Inflamm Res* 2010;59(11):921-9.

242. Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S i sur. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 2001;193(7):827-38.
243. Zhao Y, Patzer A, Herdegen T, Gohlke P, Culman J. Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma promotes neuroprotection by attenuation of neuronal cyclooxygenase-2 overexpression after focal cerebral ischemia in rats. *FASEB J* 2006;20(8):1162-75.
244. Sundararajan S, Gamboa JL, Victor NA, Wanderi EW, Lust WD, Landreth GE. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce inflammation and infarction size in transient focal ischemia. *Neuroscience* 2005;130(3):685-96.
245. Girnun GD, Domann FE, Moore SA, Robbins ME. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter. *Mol Endocrinol* 2002;16(12):2793-801.
246. Hwang J, Kleinhenz DJ, Lassègue B, Griendling KK, Dikalov S, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands regulate endothelial membrane superoxide production. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288(4):C899-905.
247. Shimazu T, Inoue I, Araki N i sur. A peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist reduces infarct size in transient but not in permanent ischemia. *Stroke* 2005;36(2):353-9.
248. Fuenzalida K, Quintanilla R, Ramos P i sur. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma up-regulates the Bcl-2 anti-apoptotic protein in neurons and induces mitochondrial stabilization and protection against oxidative stress and apoptosis. *J Biol Chem* 2007;282(51):37006-15.
249. Wu JS, Lin TN, Wu KK. Rosiglitazone and PPAR-gamma overexpression protect mitochondrial membrane potential and prevent apoptosis by upregulating anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. *J Cell Physiol* 2009;220(1):58-71.
250. Fong WH, Tsai HD, Chen YC, Wu JS, Lin TN. Anti-apoptotic actions of PPAR-gamma against ischemic stroke. *Mol Neurobiol* 2010;41(2-3):180-6.
251. Yi JH, Park SW, Brooks N, Lang BT, Vemuganti R. PPARgamma agonist rosiglitazone is neuroprotective after traumatic brain injury via anti-inflammatory and anti-oxidative mechanisms. *Brain Res* 2008;1244:164-72.
252. Thal SC, Heinemann M, Luh C, Pieter D, Werner C, Engelhard K. Pioglitazone reduces secondary brain damage after experimental brain trauma by PPAR γ independent mechanisms. *J Neurotrauma* 2011 [doi:10.1089/neu.2010.1685].
253. Sauerbeck A, Gao J, Readnower R i sur. Pioglitazone attenuates mitochondrial dysfunction, cognitive impairment, cortical tissue loss, and inflammation following traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2011;227(1):128-35.
254. Orasanu G, Ziouzenkova O, Devchand PR i sur. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone represses inflammation in a peroxisome

- proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner in vitro and in vivo in mice. *J Am Coll Cardiol* 2008;52(10):869-81.
255. Norwood SH, Berne JD, Rowe SA, Villarreal DH, Ledlie JT. Early venous thromboembolism prophylaxis with enoxaparin in patients with blunt traumatic brain injury. *J Trauma* 2008;65(5):1021-6.
 256. Wahl F, Grosjean-Piot O, Bareyre F, Uzan A, Stutzmann JM. Enoxaparin reduces brain edema, cerebral lesions, and improves motor and cognitive impairments induced by a traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 2000;17(11):1055-65.
 257. Stutzmann JM, Mary V, Wahl F, Grosjean-Piot O, Uzan A, Pratt J. Neuroprotective profile of enoxaparin, a low molecular weight heparin, in in vivo models of cerebral ischemia or traumatic brain injury in rats: a review. *CNS Drug Rev* 2002;8(1):1-30.
 258. Maeda T, Katayama Y, Kawamata T, Aoyama N, Mori T. Hemodynamic depression and microthrombosis in the peripheral areas of cortical contusion in the rat: role of platelet activating factor. *Acta Neurochir Suppl* 1997;70:102-5.
 259. Ramos-Mandujano G, Vázquez-Juárez E, Hernández-Benítez R, Pasantes-Morales H. Thrombin potently enhances swelling-sensitive glutamate efflux from cultured astrocytes. *Glia* 2007;55(9):917-25.
 260. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95(2):351-8.
 261. Callaway JK, Beart PM, Jarrott B. A reliable procedure for comparison of antioxidants in rat brain homogenates. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1998;39(3):155-62.
 262. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
 263. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th Edition. San Diego: Academic Press; 2007.
 264. Dunn-Meynell AA, Hassanain M, Levin BE. Norepinephrine and traumatic brain injury: a possible role in post-traumatic edema. *Brain Res* 1998;800(2):245-52.
 265. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010;15(4):186-90.
 266. Zhang D, Dhillon HS, Mattson MP, Yurek DM, Prasad RM. Immunohistochemical detection of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal after experimental brain injury in the rat. *Neurosci Lett* 1999;272(1):57-61.
 267. Tyurin VA, Tyurina YY, Borisenko GG i sur. Oxidative stress following traumatic brain injury in rats: quantitation of biomarkers and detection of free radical intermediates. *J Neurochem* 2000;75(5):2178-89.

268. Praticò D, Reiss P, Tang LX, Sung S, Rokach J, McIntosh TK. Local and systemic increase in lipid peroxidation after moderate experimental traumatic brain injury. *J Neurochem* 2002;80(5):894-8.
269. Lima FD, Souza MA, Furian AF i sur. Na⁺,K⁺-ATPase activity impairment after experimental traumatic brain injury: relationship to spatial learning deficits and oxidative stress. *Behav Brain Res* 2008;193(2):306-10.
270. Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Dietary curcumin counteracts the outcome of traumatic brain injury on oxidative stress, synaptic plasticity, and cognition. *Exp Neurol* 2006;197(2):309-17.
271. Opii WO, Nukala VN, Sultana R i sur. Proteomic identification of oxidized mitochondrial proteins following experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007;24(5):772-89.
272. Ansari MA, Roberts KN, Scheff SW. Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. *Free Radic Biol Med* 2008;45(4):443-52.
273. Hicks R, Soares H, Smith D, McIntosh T. Temporal and spatial characterization of neuronal injury following lateral fluid-percussion brain injury in the rat. *Acta Neuropathol* 1996;91(3):236-46.
274. Conti AC, Raghupathi R, Trojanowski JQ, McIntosh TK. Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period. *J Neurosci* 1998;18(15):5663-72.
275. Pierce JE, Smith DH, Trojanowski JQ, McIntosh TK. Enduring cognitive, neurobehavioral and histopathological changes persist for up to one year following severe experimental brain injury in rats. *Neuroscience* 1998;87(2):359-69.
276. Sato M, Chang E, Igarashi T, Noble LJ. Neuronal injury and loss after traumatic brain injury: time course and regional variability. *Brain Res* 2001;917(1):45-54.
277. Hoshino S, Kobayashi S, Furukawa T, Asakura T, Teramoto A. Multiple immunostaining methods to detect traumatic axonal injury in the rat fluid-percussion brain injury model. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2003;43(4):165-73.
278. Raghupathi R, Muir JK, Fulp CT, Pittman RN, McIntosh TK. Acute activation of mitogen-activated protein kinases following traumatic brain injury in the rat: implications for posttraumatic cell death. *Exp Neurol* 2003;183(2):438-48.
279. Hallam TM, Floyd CL, Folkerts MM i sur. Comparison of behavioral deficits and acute neuronal degeneration in rat lateral fluid percussion and weight-drop brain injury models. *J Neurotrauma* 2004;21(5):521-39.
280. Sinson G, Perri BR, Trojanowski JQ, Flamm ES, McIntosh TK. Improvement of cognitive deficits and decreased cholinergic neuronal cell loss and apoptotic cell death following neurotrophin infusion after experimental traumatic brain injury. *J Neurosurg* 1997;86(3):511-8.

281. Smith DH, Chen XH, Pierce JE i sur. Progressive atrophy and neuron death for one year following brain trauma in the rat. *J Neurotrauma* 1997;14(10):715-27.
282. Park E, Ai J, Baker AJ. Cerebellar injury: clinical relevance and potential in traumatic brain injury research. *Prog Brain Res* 2007;161:327-38.
283. Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A i sur. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 1990;51(3):283-97.
284. Lawler JM, Song W. Specificity of antioxidant enzyme inhibition in skeletal muscle to reactive nitrogen species donors. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294(5):1093-100.
285. Goss JR, Taffe KM, Kochanek PM, DeKosky ST. The antioxidant enzymes glutathione peroxidase and catalase increase following traumatic brain injury in the rat. *Exp Neurol* 1997;146(1):291-4.
286. Fan P, Yamauchi T, Noble LJ, Ferriero DM. Age-dependent differences in glutathione peroxidase activity after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2003;20(5):437-45.
287. Hayes RL, Yang K, Raghupathi R, McIntosh TK. Changes in gene expression following traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 1995;12(5):779-90.
288. McIntosh TK, Saatman KE, Raghupathi R i sur. The Dorothy Russell Memorial Lecture. The molecular and cellular sequelae of experimental traumatic brain injury: pathogenetic mechanisms. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998;24(4):251-67.
289. Marciano PG, Eberwine JH, Ragupathi R, Saatman KE, Meaney DF, McIntosh TK. Expression profiling following traumatic brain injury: a review. *Neurochem Res* 2002;27(10):1147-55.
290. Natale JE, Ahmed F, Cernak I, Stoica B, Faden AI. Gene expression profile changes are commonly modulated across models and species after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2003;20(10):907-27.
291. Siman R, McIntosh TK, Soltesz KM, Chen Z, Neumar RW, Roberts VL. Proteins released from degenerating neurons are surrogate markers for acute brain damage. *Neurobiol Dis* 2004;16(2):311-20.
292. von Gertten C, Flores Morales A, Holmin S, Mathiesen T, Nordqvist AC. Genomic responses in rat cerebral cortex after traumatic brain injury. *BMC Neurosci* 2005;6:69.
293. Kochanek AR, Kline AE, Gao WM i sur. Gel-based hippocampal proteomic analysis 2 weeks following traumatic brain injury to immature rats using controlled cortical impact. *Dev Neurosci* 2006;28(4-5):410-9.
294. Kunz T, Marklund N, Hillered L, Oliw EH. Cyclooxygenase-2, prostaglandin synthases, and prostaglandin H2 metabolism in traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 2002;19(9):1051-64.

295. Kunz T, Marklund N, Hillered L, Oliw EH. Effects of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib on cell death following traumatic brain injury in the rat. *Restor Neurol Neurosci* 2006;24(1):55-63.
296. Dash PK, Mach SA, Moore AN. Regional expression and role of cyclooxygenase-2 following experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2000;17(1):69-81.
297. Hakan T, Toklu HZ, Biber N i sur. Effect of COX-2 inhibitor meloxicam against traumatic brain injury-induced biochemical, histopathological changes and blood-brain barrier permeability. *Neurol Res* 2010;32(6):629-35.
298. Hickey RW, Adelson PD, Johnnides MJ i sur. Cyclooxygenase-2 activity following traumatic brain injury in the developing rat. *Pediatr Res* 2007;62(3):271-6.
299. Ahmad M, Rose ME, Vagni V i sur. Genetic disruption of cyclooxygenase-2 does not improve histological or behavioral outcome after traumatic brain injury in mice. *J Neurosci Res* 2008;86(16):3605-12.
300. Kelso ML, Scheff SW, Pauly JR, Loftin CD. Effects of genetic deficiency of cyclooxygenase-1 or cyclooxygenase-2 on functional and histological outcomes following traumatic brain injury in mice. *BMC Neurosci* 2009;10:108.
301. Louin G, Marchand-Verrecchia C, Palmier B, Plotkine M, Jafarian-Tehrani M. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces neurological deficit but not cerebral edema following traumatic brain injury. *Neuropharmacology* 2006;50(2):182-90.
302. Chatzipanteli K, Wada K, Busto R, Dietrich WD. Effects of moderate hypothermia on constitutive and inducible nitric oxide synthase activities after traumatic brain injury in the rat. *J Neurochem* 1999;72(5):2047-52.
303. Yang K, Mu XS, Hayes RL. Increased cortical nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) DNA binding activity after traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett* 1995;197(2):101-4.
304. Hang CH, Shi JX, Li JS, Wu W, Yin HX. Concomitant upregulation of nuclear factor-kB activity, proinflammatory cytokines and ICAM-1 in the injured brain after cortical contusion trauma in a rat model. *Neurol India* 2005;53(3):312-7.
305. Hang CH, Chen G, Shi JX, Zhang X, Li JS. Cortical expression of nuclear factor kappaB after human brain contusion. *Brain Res* 2006;1109(1):14-21.
306. Jin W, Wang H, Yan W i sur. Disruption of Nrf2 enhances upregulation of nuclear factor-kappaB activity, proinflammatory cytokines, and intercellular adhesion molecule-1 in the brain after traumatic brain injury. *Mediators Inflamm* 2008;2008:725174.
307. Sullivan PG, Bruce-Keller AJ, Rabchevsky AG i sur. Exacerbation of damage and altered NF-kappaB activation in mice lacking tumor necrosis factor receptors after traumatic brain injury. *J Neurosci* 1999;19(15):6248-56.

308. Ottens AK, Bustamante L, Golden EC i sur. Neuroproteomics: a biochemical means to discriminate the extent and modality of brain injury. *J Neurotrauma* 2010;27(10):1837-52.
309. Hicks RR, Numan S, Dhillon HS, Prasad MR, Seroogy KB. Alterations in BDNF and NT-3 mRNAs in rat hippocampus after experimental brain trauma. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;48(2):401-6.
310. Skoglösa Y, Lewén A, Takei N, Hillered L, Lindholm D. Regulation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptor type 1 after traumatic brain injury: comparison with brain-derived neurotrophic factor and the induction of neuronal cell death. *Neuroscience* 1999;90(1):235-47.
311. Kokaia Z, Gidö G, Ringstedt T i sur. Rapid increase of BDNF mRNA levels in cortical neurons following spreading depression: regulation by glutamatergic mechanisms independent of seizure activity. *Brain Res Mol Brain Res* 1993;19(4):277-86.
312. Kawahara N, Croll SD, Wiegand SJ, Klatzo I. Cortical spreading depression induces long-term alterations of BDNF levels in cortex and hippocampus distinct from lesion effects: implications for ischemic tolerance. *Neurosci Res* 1997;29(1):37-47.
313. Adachi N, Kohara K, Tsumoto T. Difference in trafficking of brain-derived neurotrophic factor between axons and dendrites of cortical neurons, revealed by live-cell imaging. *BMC Neurosci* 2005;6:42.
314. Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001;63(1):71-124.
315. McIntosh TK, Thomas M, Smith D, Banbury M. The novel 21-aminosteroid U74006F attenuates cerebral edema and improves survival after brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 1992;9(1):33-46.
316. Bareyre F, Wahl F, McIntosh TK, Stutzmann JM. Time course of cerebral edema after traumatic brain injury in rats: effects of riluzole and mannitol. *J Neurotrauma* 1997;14(11):839-49.
317. Clough RW, Neese SL, Sherill LK i sur. Cortical edema in moderate fluid percussion brain injury is attenuated by vagus nerve stimulation. *Neuroscience* 2007;147(2):286-93.
318. Vink R, Mullins PG, Temple MD, Bao W, Faden AI. Small shifts in craniotomy position in the lateral fluid percussion injury model are associated with differential lesion development. *J Neurotrauma* 2001;18(8):839-47.
319. Diab A, Deng C, Smith JD i sur. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2002;168(5):2508-15.

320. Maeshiba Y, Kiyota Y, Yamashita K, Yoshimura Y, Motohashi M, Tanayama S. Disposition of the new antidiabetic agent pioglitazone in rats, dogs, and monkeys. *Arzneimittelforschung* 1997;47(1):29-35.
321. Schmidt RH, Grady MS. Regional patterns of blood-brain barrier breakdown following central and lateral fluid percussion injury in rodents. *J Neurotrauma* 1993;10(4):415-30.
322. Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L i sur. Acute treatment with the PPARgamma agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1-42 levels in APPV717I transgenic mice. *Brain* 2005;128(Pt 6):1442-53.
323. Xing B, Xin T, Hunter RL, Bing G. Pioglitazone inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase is associated with altered activity of p38 MAP kinase and PI3K/Akt. *J Neuroinflammation* 2008;5:4.
324. Kaundal RK, Sharma SS. GW1929: a nonthiazolidinedione PPAR γ agonist, ameliorates neurological damage in global cerebral ischemic-reperfusion injury through reduction in inflammation and DNA fragmentation. *Behav Brain Res* 2011;216(2):606-12.
325. Crosby MB, Svenson J, Gilkeson GS, Nowling TK. A novel PPAR response element in the murine iNOS promoter. *Mol Immunol* 2005;42(11):1303-10.
326. Konturek PC, Brzozowski T, Kania J, Konturek SJ, Kwiecien S, Pajdo R, Hahn EG. Pioglitazone, a specific ligand of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, accelerates gastric ulcer healing in rat. *Eur J Pharmacol* 2003;472(3):213-20.
327. Konturek PC, Brzozowski T, Burnat G, Szlachcic A, Koziel J, Kwiecien S, Konturek SJ, Harsch IA. Gastric ulcer healing and stress-lesion preventive properties of pioglitazone are attenuated in diabetic rats. *J Physiol Pharmacol* 2010;61(4):429-36.
328. Taniguchi Y, Ooie T, Takahashi N, Shinohara T, Nakagawa M, Yonemochi H, Hara M, Yoshimatsu H, Saikawa T. Pioglitazone but not glibenclamide improves cardiac expression of heat shock protein 72 and tolerance against ischemia/reperfusion injury in the heredity insulin-resistant rat. *Diabetes* 2006;55(8):2371-8.
329. Heneka MT, Gavriluk V, Landreth GE, O'Banion MK, Weinberg G, Feinstein DL. Noradrenergic depletion increases inflammatory responses in brain: effects on IkappaB and HSP70 expression. *J Neurochem* 2003;85(2):387-98.
330. Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 1998;20(4):709-26.
331. Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Cerù MP. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 2004;123(1):131-45.
332. Toyomoto M, Ohta M, Okumura K i sur. Prostaglandins are powerful inducers of NGF and BDNF production in mouse astrocyte cultures. *FEBS Lett* 2004;562(1-3):211-5.

333. Soares AF, Nosjean O, Cozzzone D i sur. Covalent binding of 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 to PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;337(2):521-5.
334. Jonas S, Sugimori M, Llinas R. Is low molecular weight heparin a neuroprotectant? *Ann NY Acad Sci* 1997;825:389-93.
335. Wei EP, Lamb RG, Kontos HA. Increased phospholipase C activity after experimental brain injury. *J Neurosurg* 1982;56(5):695-8.
336. Prasad MR, Dhillon HS, Carbary T, Dempsey RJ, Scheff SW. Enhanced phosphodiesteric breakdown of phosphatidylinositol biphosphate after experimental brain injury. *J Neurochem* 1994;63(2):773-6.
337. Dhillon HS, Carbary T, Dose J, Dempsey RJ, Prasad MR. Activation of phosphatidylinositol biphosphate signal transduction pathway after experimental brain injury: a lipid study. *Brain Res* 1995;698(1-2):100-6.
338. Fiskum G. Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural cell death. *J Neurotrauma* 2000;17(10):843-55.
339. Schwartz D, Engelhard D, Gallily R, Matoth I, Brenner T. Glial cells production of inflammatory mediators induced by *Streptococcus pneumoniae*: inhibition by pentoxifylline, low-molecular-weight heparin and dexamethasone. *J Neurol Sci* 1998;155(1):13-22.
340. Górski A, Wasik M, Nowaczyk M, Korczak-Kowalska G. Immunomodulating activity of heparin. *FASEB J* 1991;5(9):2287-91.
341. Gikakis N, Khan MM, Hiramatsu Y i sur. Effect of factor Xa inhibitors on thrombin formation and complement and neutrophil activation during in vitro extracorporeal circulation. *Circulation* 1996;94(9 Suppl):II341-6.
342. Yanaka K, Nose T. Heparin ameliorates brain injury by inhibiting leukocyte accumulation. *Stroke* 1996;27(11):2146-7.
343. Tyrrell DJ, Horne AP, Holme KR, Preuss JM, Page CP. Heparin in inflammation: potential therapeutic applications beyond anticoagulation. *Adv Pharmacol* 1999;46:151-208.
344. Cirino G, Cicala C, Bucci M i sur. Factor Xa as an interface between coagulation and inflammation. Molecular mimicry of factor Xa association with effector cell protease receptor-1 induces acute inflammation in vivo. *J Clin Invest* 1997;99(10):2446-51.
345. Libersan D, Khalil A, Dagenais P i sur. The low molecular weight heparin, enoxaparin, limits infarct size at reperfusion in the dog. *Cardiovasc Res* 1998;37(3):656-66.
346. Manduteanu I, Dragomir E, Voinea M, Capraru M, Simionescu M. Enoxaparin reduces H₂O₂-induced activation of human endothelial cells by a mechanism involving cell adhesion molecules and nuclear transcription factors. *Pharmacology* 2007;79(3):154-62.

347. Manduteanu I, Voinea M, Capraru M, Dragomir E, Simionescu M. A novel attribute of enoxaparin: inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells by a mechanism involving cell adhesion molecules. *Pharmacology* 2002;65(1):32-7.
348. Gikakis N, Rao AK, Miyamoto S i sur. Enoxaparin suppresses thrombin formation and activity during cardiopulmonary bypass in baboons. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;116(6):1043-51.
349. Newton R, Kuitert LM, Bergmann M, Adcock IM, Barnes PJ. Evidence for involvement of NF-kappaB in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1beta. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237(1):28-32.
350. Nakao S, Ogtata Y, Shimizu E, Yamazaki M, Furuyama S, Sugiya H. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NFkappaB in human gingival fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 2002;238(1-2):11-8.