

**Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet**

mr Snježana Petrović

**SPECIFIČNO VEZIVANJE I EFEKAT
ESTRADIOLA NA TRANSPORT KALCIJUMA U
MITOHONDRIJE IZOLOVANE IZ NERVNIH
ZAVRŠETAKA REGIONA MOZGA PACOVA**

-Doktorska disertacija-

Beograd, 2011.

Sadržaj

I UVOD	1
1. Transport Ca^{2+} u nervnoj ćeliji	2
1.1. Transport Ca^{2+} kroz plazma membranu nervnih ćelija	3
1.1.1. Voltažno-zavisni Ca^{2+} kanali (VGCC)	3
1.1.2. Ligandom-posredovani Ca^{2+} kanali (ROC)	3
1.1.3. Kalcijumski kanali koje aktivira unutarćelijski Ca^{2+} (SOC)	4
1.1.4. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$-izmenjivač (NCX)	4
1.1.5. Plazma membranska Ca^{2+}-ATPaza (PMCA)	5
1.2. Transport Ca^{2+} u mitohondrijama	5
1.2.1. Voltažno-zavisni anjon-selektivni kanali (VDAC)	5
1.2.2. Rutenijum red-osetljivi uniporter (RU)	6
1.2.3. Mitohondrijski $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$-izmenjivač (mtNCX)	6
1.2.4. Mitohondrijske tranzicione pore (MTP)	7
2. Akumulacija Ca^{2+} u mitohondrijama	8
2.1. Fiziološki značaj	8
2.2. Uloga u patofiziološkim procesima i apoptozi	9
3. Uticaj estradiola na CNS	11
3.1. Estradiolski receptori (ER)	12
3.1.1. $\text{ER}\alpha$ i $\text{ER}\beta$	12
3.1.2. Drugi membranski (mER) i mitohondrijski (mtER) receptori za estradiol	13
<i>3.1.2.1. Estradiol-vezujuća mesta</i>	14
3.2. Mehanizmi delovanja estradiola	14
3.2.1. Kasni efekti estradiola	15
3.2.2. Rani efekti estradiola	15
3.2.3. Oksido/reduktivni krug estradiola	17
3.3. Neuroprotektivni uticaji estradiola	18
3.3.1. Neuroprotekcija u neurodegenerativnim bolestima	19
3.3.2. Uticaj estradiola na mitohondrije	19

3.3.2.1. Estradiol i oksidativni stres	20
3.3.2.2. Metabolizam Ca^{2+}	20
3.3.2.3. Estradiol i apoptoza	21
II CILJEVI RADA	22
III MATERIJAL I METODE	24
1. Hemikalije	24
2. Životinje	25
2.1. Priprema tkiva	25
2.2. Izolovanje sinaptozoma	26
2.3. Izolovanje sinaptozomalnih mitohondrija	26
3. Određivanje koncentracije proteina	29
4. Ispitivanje enzimске aktivnosti F_0F_1-ATPaze	29
5. Enzimi imunoesej (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay)	30
5.1. Priprema seruma	30
5.2. Određivanje koncentracije estradiola u serumu	30
6. Transport Ca^{2+} u mitohondrijama	31
6.1. Ulazak Ca^{2+}	31
6.1.1. Ulazak Ca^{2+} u kontrolnim uslovima	31
6.1.2. Uticaj estradiola na ulazak Ca^{2+}	32
6.1.3. Efekat FCCP	32
6.2. Na^+ -zavisni izlazak Ca^{2+}	32
6.2.1. Izlazak Ca^{2+} u kontrolnim uslovima	33
6.2.2. Uticaj estradiola na izlazak Ca^{2+}	33
6.2.3. Izlazak Ca^{2+} u prisustvu antagonista i agonista estradiolskih receptora	34
6.2.4. Određivanje kinetičkih karakteristika Na^+ -zavisnog izlaska Ca^{2+}	34
7. Praćenje potencijala mitohondrijske membrane ($\Delta\Psi_m$)	35
8. Statistička analiza podataka	35
9. Vezivanje estradiola za sinaptozomalne mitohondrije	36
9.1. Određivanje kinetičkih karakteristika vezivanja estradiola za izolovane sinaptozomalne mitohondrije	37
10. Western blot analiza	38

IV REZULTATI	40
1. Provera prečišćenosti mitohondrijskih preparat	40
2. Aktivnost F₀F₁- ATPaze	41
2.1. Aktivnost F₀F₁-ATPaza u sinaptozomalnim mitohondrijama izolovanim iz celog mozga intaktnih i ovarijektomisanih životinja	42
2.2. Aktivnost F₀F₁-ATPaze u sinaptozomalnim mitohondrijama izolovanim iz hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla ovarijektomisanih životinja	42
3. Određivanje koncentracije estradiola u serumu	45
4. Efekat estradiola <i>in vitro</i> na ulazak Ca²⁺ u sinaptozomalne mitohondrije različitih regiona mozga pacova	46
4.1. Ulazak Ca²⁺ u sinaptozomalne mitohondrije izolovane iz hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla u kontrolnim uslovima	46
4.2. Efekat estradiola na ulazak Ca²⁺ u sinaptozomalne mitohondrije izolovane iz hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla, <i>in vitro</i>, u zavisnosti od koncentracije	46
4.3. Uticaj estradiola na potencijal mitohondrijske membrane ($\Delta\Psi_m$) i ulazak Ca²⁺ u sinaptozomalne mitohondrije izolovane iz hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla	47
5. Efekat estradiola <i>in vitro</i> na Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ iz mitohondrija različitih regiona mozga pacova	53
5.1. Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ iz sinaptozomalnih mitohondrija u kontrolnim uslovima i u prisustvu estradiola	53
5.2. Uticaj različitih koncentracija egzogenog Na⁺ na Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ iz sinaptozomalnih mitohondrija	53
6. Specifično vezivanje estradiola za sinaptozomalne mitohondrije različitih regiona mozga pacova	58
6.1. Optimizacija uslova za ispitivanje specifičnog vezivanja estradiola	58
6.2. Karakteristike specifičnog vezivanja estradiola za sinaptozomalne mitohondrije hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla	59
7. Mehanizam delovanja estradiola <i>in vitro</i> na Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ iz sinaptozomalnih mitohondrija različitih regiona mozga pacova	66

7.1. Membranski efekat	66
7.2. Uloga mitohondrijskih estradiolskih receptora u modulaciji izlaska Ca^{2+} pod delovanjem estradiola	69
7.2.1. Imunoblot analiza ekspresije ERα i ERβ	69
7.2.2. Efekat antagoniste estradiolskih receptora, ICI 182,780, na inhibiciju Na⁺-zavisnog izlaska Ca^{2+} pod delovanjem estradiola	69
7.2.3. Uticaj specifičnih agonista estradiolskih receptora, PPT i DPN, na Na⁺-zavisni izlazak Ca^{2+}	70
7.2.4. Uticaj inhibitora mitohondrijskog Na⁺/Ca²⁺-izmenjivača, CGP 37157, na Na⁺-zavisni izlazak Ca^{2+} iz sinaptosomalnih mitohondrija i uloga ERα i/ili ERβ	70
V DISKUSIJA	76
VI ZAKLJUČCI	89
VII LITERATURA	92

I UVOD

Kalcijum je element sveprisutan u živoj prirodi. S jedne strane on je gradivni element biljnih i životinjskih tkiva (ćelijski zid biljaka, ljuštine mekušaca, skelet kičmenjaka), a sa druge strane, u svom jonskom obliku (Ca^{2+}), ima važnu ulogu prenosioca signala u ćeliji i to od samog trenutka oplodnje i začetka novog života do odumiranja ćelija i smrti organizma. Preduslov signalne funkcije Ca^{2+} su oscilacije koncentracije Ca^{2+} u citosolu ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) koje se odvijaju u kontrolisanom opsegu od 20-100 nmol/l kod ćelija u mirovanju do > 500 nmol/l dok traje prenos signala (signalna transdukcija) (Exton, 1985; Colegrove i sar., 2000). Žive ćelije su razvile brojne mehanizme za kontrolu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ koji su locirani kako na ćelijskoj membrani tako i na membranama ćelijskih organela, kao na primer endoplazmatičnog retikuluma i mitohondrija. Osim što omogućavaju brz porast koncentracije Ca^{2+} za potrebe prenosa signala, ovi mehanizmi transportom Ca^{2+} iz citosola, sprečavaju citotoksične efekte Ca^{2+} do kojih bi došlo usled produženog zadržavanja visokih koncentracija $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Zato je jasno da bi svaki agens, koji bi imao uticaj na aktivnost bilo kog mehanizma za transport Ca^{2+} , istovremeno značajno uticao na ukupnu ćelijsku Ca^{2+} -homeostazu, a time i na celokupnu ćelijsku aktivnost i preživljavanje.

Ova doktorska teza, koja obuhvata nastavak ranije započetih istraživanja, bavi se izučavanjem uticaja steroidnog hormona estradiola (E2) na mitohondrijske Ca^{2+} -transportne

mehanizme u nervnom tkivu, tj. određenim moždanim regionima: hipokampusu, kaudalnom jedru i moždanom stablu. Ona je pokušaj da se dođe do novih saznanja u istraživanju uloge estradiola u regulaciji koncentracije Ca^{2+} u nervnim ćelijama, a na taj način i u modulaciji ukupne nervne aktivnosti.

1. Transport Ca^{2+} u nervnoj ćeliji

Regulacija koncentracije slobodnih Ca^{2+} jona je od velike važnosti za normalno funkcionisanje ćelija, naročito nadražljivih (Carafoli, 1987; Philipson, 1999; Berridge, 2003). Najveći deo kalcijuma prisutnog u nervnoj ćeliji nalazi se u formi vezanog za proteine (parvalbumin, kalmodulin, sinexin). Međutim, za prenošenje nervnog impulsa, od ukupnog sadržaja kalcijuma u nervnoj ćeliji, prvenstveno su važni slobodni Ca^{2+} joni. U periodu mirovanja, njihova koncentracija u citoplazmi neurona je ≤ 100 nmol/l (Siesjo, 1990). Citoplazmatski Ca^{2+} kontroliše mnoge aspekte funkcionisanja nervnih ćelija od nadražljivosti neurona (Exton, 1985; Weerth i sar., 2007), preko integracije električnih signala (Miller, 1991; Verkhratsky, 2006) i sinaptičke plastičnosti (Emptage i sar., 2001; Han i sar., 2007) do kontrole ekspresije gena (West i sar., 2001; Carrasco i Hidalgo, 2006) i apoptotskih procesa (Turner i sar., 2007). Povišena koncentracija Ca^{2+} u citosolu je jedan od najznačajnijih preduslova za oslobađanje neurotransmitera tokom procesa prenošenja nervnog impulsa, dok je snižavanje koncentracije Ca^{2+} na nivo pre nailaska nervnog impulsa neophodno da bi nervna ćelija bila sposobna za ponovnu neurotransmisiju (Siesjo, 1990). Jedna od aktivnosti kojom se to postiže je izbacivanje suvišnog Ca^{2+} iz ćelije kroz plazma membranu, dok je druga važna aktivnost za snižavanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$ prikupljanje Ca^{2+} u ćelijskim organelama (Račay i sar., 1994).

Dugo se smatralo da je endoplazmatični retikulum ključna organela u procesu eliminacije viška Ca^{2+} preostalog u citosolu nakon prolaska nervnog impulsa. Razvojem tehnika za detekciju prisustva Ca^{2+} , pokazano je da dominantnu ulogu u tom procesu imaju mitohondrije. Na mitohondrijskim membranama nađeni su Ca^{2+} -transportni mehanizmi, koji im daju sposobnost da primaju i otpuštaju Ca^{2+} i na taj način učestvuju u regulaciji $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

S obzirom da se u ovom radu nameravamo baviti praćenjem transporta Ca^{2+} u mitohondrijama i da taj transport predstavlja bitnu komponentu u regulaciji ukupne

koncentracije Ca^{2+} u nervnim ćelijama, u nastavku ćemo dati pregled plazma membranskih i mitohondrijskih Ca^{2+} -transportnih mehanizama.

1.1. Transport Ca^{2+} kroz plazma membranu nervnih ćelija

Transport Ca^{2+} kroz plazma membranu nervnih ćelija se odvija aktivnošću nekoliko membranski lociranih kanala i jonskih transportera.

1.1.1. Voltažno-zavisni Ca^{2+} kanali (VGCC)

Voltažno-zavisni Ca^{2+} kanali su transmembranski Ca^{2+} kanali koji se otvaraju tokom depolarizacije plazma membrane, i zahvaljujući elektrohemijском gradijentu, omogućavaju ulazak Ca^{2+} u citosol. Biohemijсka karakterizacija je pokazala da se radi o višečlanom proteinskom kompleksu u čiji sastav ulaze: α_1 subjedinica koja formira membransku poru, transmembranski lociran kompleks α_2 i δ subjedinica povezanih disulfidnim vezama, unutarćelijska β subjedinica i u nekim slučajevima transmembranska γ subjedinica (Catterall, 2000). Svaka od subjedinica postoji u više varijanti što omogućava raznovrsnost građe i funkcije ovih kanala.

Na osnovu elektrofizioloških ispitivanja ustanovljeno je da se VGCC razlikuju prema potrebnom membranskom potencijalu koji ih otvara i dužini otvorenosti. Zato su podeljeni u dve grupe. Prvu grupu čini više tipova kanala (L-, N-, P-, Q- i R-tip) koji imaju zajedničku osobinu da ih otvara visok membranski potencijal. Drugu grupu predstavljaju T-tip kanali, koje otvara nizak membranski potencijal, a koji se potom brzo zatvaraju (De Waard i sar., 1996, Catterall, 2000). Pomenuti tipovi kanala su različito prisutni i imaju specifičnu funkciju u pojedinim tkivima, a ujedno je svaki od njih detektovan i u mozgu.

1.1.2. Ligandom-posredovani Ca^{2+} kanali (ROC)

Ligandom-posredovani Ca^{2+} kanali su jonski kanali do čijeg otvaranja dolazi nakon vezivanja odgovarajućeg hemijskog liganda (neurotransmitera). Glavni neurotransmiter koji dovodi do ekscitacije neurona u centralnom nervnom sistemu (CNS) sisara je glutamat (Jonas i Burnashev, 1995). U zavisnosti od razlika u funkcionisanju, lokaciji i farmakološkoj osetljivosti glutamatski receptori se dele na jonotropne i metabotropne (Seeburg, 1993; Ozawa,

1996). Dok jonotropni receptori zapravo predstavljaju sam jonski kanal, metabotropni receptori deluju preko aktivacije G-proteina. Na osnovu osetljivosti na različite agoniste, jonotropni receptori se dele na NMDA (N-metil-D-aspartat), AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionat) i kainatne. Kretanje Ca^{2+} preko NMDA receptora je naročito značajno za ostvarivanje sinaptičke plastičnosti i modulaciju sinapsi tokom procesa učenja i pamćenja (Berridge, 1998), kao i za aktivaciju gena odgovornih za preživljavanje neurona (Papadia i sar., 2005; Zhang i sar., 2007). Aktivacija Ca^{2+} -propusnih AMPA receptora stimuliše aktivnost nekih transkripcionih faktora kao što su CREB i AP-1 (Perkinton i sar., 1999; Santos i sar., 2006).

1.1.3. Kalcijumski kanali koje aktivira unutarćelijski Ca^{2+} (SOC)

Ulazak Ca^{2+} preko kalcijumskih kanala koje aktivira unutarćelijski Ca^{2+} učestvuje u punjenju i sprečava pražnjenje unutarćelijskih spremišta za kalcijum, i na taj način doprinosi ostvarivanju signalne uloge Ca^{2+} u aktivaciji genske transkripcije i ćelijskog metabolizma (Parekh i Putney, Jr., 2005). Do sada najbolje opisani predstavnici ove grupe su tzv. CRAC kanali, koji se aktiviraju usled otpuštanja Ca^{2+} iz unutarćelijskih spremišta. U njihovoj građi detektovani su plazma membranski protein Orai1 i protein nađen u endoplazmatičnom retikulumu STIM1.

1.1.4. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivač (NCX)

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivač je plazma membranski jonski transporter, koji koristeći elektrohemijski gradijent Na^+ , prenosi jedan jon Ca^{2+} u zamenu za tri jona Na^+ . U uslovima mirovanja nervne ćelije njegova aktivnost ide u pravcu izbacivanja kalcijuma iz citosola, uz istovremeni unos natrijuma. Zahvaljujući niskom afinitetu i visokom kapacitetu za Ca^{2+} , NCX u uslovima povišene koncentracije Ca^{2+} u citosolu, vezuje i transportuje relativno velike količine kalcijumovih jona (Philipson i Nicoll, 2000). Na taj način izmenjivač, nakon prolaska akcionog potencijala, izbacuje višak Ca^{2+} preostao u citosolu nervnih ćelija i vraća koncentraciju Ca^{2+} na nivo u mirovanju. Međutim, tokom samog prolaska akcionog potencijala kada dolazi do depolarizacije plazma membrane i reverzije Na^+ -gradijenta, izmenjivač funkcioniše u obrnutom smeru tako da izbacuje Na^+ , a unosi Ca^{2+} u citosol (Jeffs i sar., 2007). Postoje tri izoforme NCX. NCX 1 izoforma je zastupljena u brojnim organima, uključujući

mozak, srce, bubrege i skeletne mišiće, dok su NCX2 i NCX3 nađeni samo u mozgu i skeletnim mišićima (Lee i sar., 1994).

1.1.5. Plazma membranska Ca^{2+} -ATPaza (PMCA)

Plazma membranska Ca^{2+} -ATPaza je membranski transportni protein koji koristi energiju dobijenu hidrolizom ATP za izbacivanje kalcijuma iz ćelija, pri čemu sa za izbacivanje dva jona Ca^{2+} utroši jedna molekula ATP (Monteith i sar., 1998). Za razliku od $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača, plazma membranska Ca^{2+} -ATPaza ima visok afinitet i nizak kapacitet za Ca^{2+} , pa je njena aktivnost posebno važna za održavanje niske koncentracije Ca^{2+} u citosolu neurona tokom perioda mirovanju (Blaustein, 2002). Postoje četiri glavne izoforme PMCA (PMCA1-4). Svaka od njih je detektovana i u mozgu (Greeb i Shull, 1989; Keeton i sar., 1993; Brown i sar., 1996).

1.2. Transport Ca^{2+} u mitohondrijama

Pored toga što su glavni proizvođači energije (ATP), mitohondrije imaju važnu ulogu u održavanju Ca^{2+} -signalizacije u nervnom tkivu. Štaviše, zahvaljujući svojoj sposobnosti da brzo akumuliraju Ca^{2+} , mitohondrije učestvuju u modulaciji amplitude Ca^{2+} -signala (Nicholls i sar., 2003). Nekoliko različitih Ca^{2+} -transportnih mehanizama je uključeno u regulciju količine kalcijuma koja će biti pohranjena u mitohondrijama.

1.2.1. Voltažno-zavisni anjon-selektivni kanali (VDAC)

Voltažno-zavisni anjon-selektivni kanali su odgovorni za transport Ca^{2+} kroz spoljašnju mitohondrijsku membranu (Gincel i Shoshan-Bermatz, 2001). U otvorenom stanju, oni su nisko selektivni za anjone, dok njihovom zatvaranju podjednako doprinose i pozitivni i negativni potencijal (Lemasters i Holmunhamedov, 2006). Mali joni, kao što su Ca^{2+} , mogu slobodno proći kroz VDAC čak i kada se oni nalaze u zatvorenom stanju. U ćelijama sisara su do sada detektovane tri forme ovih kanala i za sve tri je dokazano prisustvo u mitohondrijama mozga (Cesar Mde i Wilson, 2004).

1.2.2. Rutenijum red-osetljivi uniporter (RU)

Rutenijum red-osetljivi uniporter su dobili ime po tome što ih inhibira glikoproteinska boja rutenijum red. Locirani na unutrašnjoj membrani mitohondrija, svojom građom predstavljaju složene glikoproteinske komplekse u čijem sastavu se nalaze visokoselektivni Ca^{2+} kanali (Saris i Carafoli, 2005). Njihova je uloga da omogućavaju prolazak Ca^{2+} iz citoplazme u mitohondrijski matriks bez istovremenog kretanja drugih jona (Gunter i sar., 2000). Glavna pokretačka snaga ulaska Ca^{2+} u mitohondrije kroz RU je postojanje elektrohemijskog gradijenta na mitohondrijskoj membrani tj. potencijal mitohondrijske membrane ($\Delta\Psi_m$) i zato će svaki agens koji utiče na $\Delta\Psi_m$ indirektno modulirati i unos Ca^{2+} (Gunter i Gunter, 1994; Pi i sar., 2007). Kada citosolna koncentracija Ca^{2+} u blizini mitohondrija dosegne ~ 500 nmol/l dolazi do stimulacije protok jona kroz RU, tako da ulazak Ca^{2+} u mitohondrije prevazilazi njihov izlazak (Nicholls i Scott, 1980; Wang i Thayer, 1996). Dakle, upravo RU daju mitohondrijama sposobnost da se ponašaju kao spremišta za Ca^{2+} . Iako nekoliko starijih studija govori o proteinima izolovanim iz mitohondrija različitih tkiva, koji vezuju rutenijum red i Ca^{2+} i za koje se prema tome pretpostavljalo da učestvuju u građi RU (Panfili i sar., 1976; Mironova i sar., 1982, Bernardi i sar., 1984; Zazueta i sar., 1998), genetsko poreklo i peptidna sekvenca proteina u sastavu ovih kanala još uvek nisu definisani.

1.2.3. Mitohondrijski $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivač (mtNCX)

Neosporno se zna da je glavni zadatak aktivnosti mitohondrijskih $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača da izbacujući Ca^{2+} iz mitohondrija održavaju nisku koncentraciju Ca^{2+} u matriksu ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) (Crompton i Costi, 1990; Nicholls i Akerman, 1982), ali još uvek nije pouzdano utvrđeno da li su mtNCX zasebna grupa transportera ili su oni identični sa plazma membranskim NCX (plmNCX) (Palty i sar., 2010) Kada su u pitanju molekularni identitet, odnos jona tokom $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmene i osetljivost na različite jone i inhibitore, postoje studije koje idu u prilog i jednom i drugom mišljenju (Li i sar., 1992; Minelli i sar., 2007; Castaldo i sar., 2009).

Na osnovu rezultata dobijenih primenom antitela na plazma membranski $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivač u imunohistohemijskoj analizi i elektronskoj-mikroskopiji distribucije $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača u CNS-u, nađen je jak signal na mitohondrijama što je ukazalo da mitohondrijski $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivači (bar izvesnim delom) pripadaju skupini izoformi plmNCX1-3 (Minelli i

sar; 2007, Castaldo i sar., 2009). Gobbi i saradnici (2007), Western blot analizom mitohondrijskih proteina, potvrđuju tu pretpostavku za mtNCX u neuronima i astrocitima mozga pacova (Gobbi i sar., 2007). Istovremeno, nađeno je da antitelo na mtNCX iz mitohondrija srca goveda, reaguje sa mitohondrijama srca, jetre i bubrega, ali ne i sa plazma membranskom frakcijom i mitohondrijama mozga, zbog čega je zaključeno da su mitohondrijski i plazma membranski NCX različiti proteini, ali i da postoji različitost između samih mitohondrijskih NCX (Li i sar., 1992). Premda je građa mtNCX još uvek nedovoljno definisana, zna se da oni poseduju tri glavna domena: domen niskog afiniteta za Ca^{2+} okrenut ka citosolu, transmembranski region i domen relativno visokog afiniteta za Ca^{2+} okrenut ka mitohondrijskom matriksu. Dugo se smatralo da je mitohondrijska $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmena elektroneutralna, tj. da mtNCX istovremeno sa transportom jednog jona Ca^{2+} iz mitohondrija u citoplazmu transportuju dva jona Na^+ u suprotnom pravcu (Affolter i Carafoli, 1980; Brand, 1985). U novije vreme sve više se govori o elektogenoj aktivnosti mtNCX, bar kada su u pitanju nedražljive ćelije. Tako više grupa autora govori o zameni jednog Ca^{2+} za tri Na^+ radom mtNCX u neuronima, što ponovo ukazuje na sličnost sa plazma membranskim izmenjivačem (Bernardi, 1999; Giacomello i sar., 2007, Kim i Matsuoka, 2008, Dash i Beard, 2008). Sličnosti i razlike postoje i u osetljivosti mtNCX i plmNCX na različite jone i inhibitore. Mitohondrijski za razliku od plazma membranskih NCX mogu umesto jona Na^+ da transportuju i jone Li^+ (Matsuda i sar., 1997). Joni Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} i Mn^{2+} i lekovi diltiazem, verapamil i klonazepam (Bernardi, 1999) inhibiraju oba transportera, dok je CGP 37157 specifični inhibitor samo mtNCX (Chiesi i sar., 1988; Castaldo i sar., 2009).

1.2.4. Mitohondrijske tranzicione pore (MTP)

Mitohondrijske tranzicione pore su veliki kanali na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani koji neselektivno propuštaju jone i molekule veličine do 1.5 kDa (Robertson i sar., 2009). Ključan činilac koji dovodi do formiranja MTP je visoka koncentracija Ca^{2+} u mitohondrijskom matriksu (~1-3 $\mu\text{mol/l}$), ali do njihove aktivnosti dolazi tek u prisustvu drugih aktivirajućih agenasa kao što su spermin, glutation, akumulacija neorganskog fosfata, gubitak potencijala mitohondrijske membrane i oksidativni stres (Simpson i Russell, 1998; Brustovetsky i sar., 2002). Nađeno je da u građi pora učestvuju translokaza adeninskih nukleotida, ciklofilin-D, kao i voltažno-zavisni anjon-selektivni kanali (Crompton, 1999).

2. Akumulacija Ca^{2+} u mitohondrijama

Kao rezultat aktivnosti mitohondrijskih Ca^{2+} -transportnih mehanizama, dolazi do akumulacije Ca^{2+} u mitohondrijskom matriksu u situacijama povišene koncentracije Ca^{2+} u citosolu, odnosno do otpuštanja Ca^{2+} iz mitohondrija kad se koncentracija Ca^{2+} u citosolu vrati na nivo u mirovanju. Akumulacija Ca^{2+} u mitohondrijama ima veliki fiziološki značaj, dok je njeno narušavanje povezano sa pokretanjem brojnih patofizioloških procesa.

2.1. Fiziološki značaj

Ideja o ulozi mitohondrija u održavanju unutarćelijske Ca^{2+} -homeostaze se pojavila 60-tih godina prošlog veka, kad je uočeno da izolovane mitohondrije mogu u kratkom vremenu akumulirati velike količine Ca^{2+} iz medijuma bogatog kalcijumom ($>10 \mu\text{mol/l}$). Ipak tek u novije vreme je pokazano da mitohondrije efikasno prikupljaju Ca^{2+} i pri fiziološkim koncentracijama Ca^{2+} u citosolu. Fiziološki značaj tih aktivnosti je i dalje predmet rasprave u kojoj dominiraju dve teorije.

Prema prvoj teoriji, glavni zadatak mitohondrijske akumulacije Ca^{2+} jeste da omogući mitohondrijama da se ponašaju kao privremena skladišta Ca^{2+} pre njegovog uklanjanja iz ćelije aktivacijom plazma membranskih transportnih mehanizama (Nicholls i Akerman, 1982). Na taj način mitohondrije sprečavaju patološki porast $[\text{Ca}^{2+}]_i$ koji bi mogao imati citotoksični efekat i pokrenuti proces ćelijske smrti (Sattler i Tymianski, 2000; Chelyshev i sar., 2001). U skladu sa ovom teorijom su i podaci o rasporedu mitohondrija unutar ćelije. Ove organele su pretežno locirane blizu mesta ulaska Ca^{2+} u citosol tj. uz plazma membranu i endoplazmatski retikulum. Istovremeno, u tim zonama su uočena izrazito ograničena ($< 1 \mu\text{m}$) mesta sa visokim nivoom $[\text{Ca}^{2+}]_i$, koja nastaju usled otvaranja male grupe ili čak pojedinačnih Ca^{2+} -kanala na plazma membrani ili membrani endoplazmatskog retikuluma, i nazivaju se Ca^{2+} mikrodomeni (De Crescenzo, 2004; Rizzuto i Pozzan, 2006). Smatra se da je smisao postojanja mikrodomena u omogućavanju paralelnog odvijanje različitih signalnih procesa u različitim ćelijskim regionima, što neuronima daje sposobnost istovremenog procesiranja i skladištenja velikog broja podataka (Berridge, 2006). Nalaženjem korelacije između ulaska Ca^{2+} u mitohondrije i njihove blizine Ca^{2+} mikrodomenima, dodatno je potvrđena uloga mitohondrija

u kontroli porasta koncentracije Ca^{2+} u citosolu nervnih ćelija (Alonso i sar., 2006; Spat i sar., 2009).

Prema drugoj teoriji, akumulacija Ca^{2+} u mitohondrijama je prvenstveno bitna za preciznu kontrolu ćelijskog energetskog metabolizma i zato je njen glavni zadatak da moduliše koncentraciju Ca^{2+} u mitohondrijskom matriksu u skladu sa promenama koncentracije Ca^{2+} u citosolu. Ovu teoriju podržava činjenica da porast $[\text{Ca}^{2+}]_m$ nastao kao odgovor na porast nivoa $[\text{Ca}^{2+}]_i$, aktivira tri mitohondrijske Ca^{2+} -zavisne dehidrogenaze važne za odvijanje reakcija Krebsovog ciklusa. Ca^{2+} direktno interreaguje sa nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+)-izocitrat dehidrogenazom i 2-oksoglutarat dehidrogenazom snižavajući njihove K_m za odgovarajući supstrat, dok u slučaju dehidrogenaze pirogroždane kiseline Ca^{2+} dovodi do defosforilacije i aktivacije enzima (Robb-Gasper i sar., 1998; Giacomello i sar., 2007). Kao posledica aktivacije pomenutih enzima javlja se porast sinteze NADH , glavnog redukujućeg agensa u procesu transporta elektrona i supstrata brojnih enzima odgovornih za postranslacione modifikacije proteina, kao i porast sinteze ATP (McCormack i Denton, 1993; Hajnoczky i sar., 1995, Jouaville i sar., 1999). Slobodni Ca^{2+} prisutan u matriksu deluje i na enzime učesnike elektron-transportnog lanca, F_0F_1 -ATP sintazu/ ATP azu i adenin nukleotid translokazu, stimulišući njihovu aktivnost (Gunter i sar., 2000; Nilsen i sar., 2003). Na taj način, aktivacijom enzima Krebsovog ciklusa i elektron-transportnog lanca, akumulacija Ca^{2+} u mitohondrijama dovodi do usklađivanja mitohondrijskog i ćelijskog metabolizma tj. produkcije energije u mitohondrijama sa ćelijskim potrebama za energijom (Babcock i Hille, 1998).

2.2. Uloga u patofiziološkim procesima i apoptozi

Zbog direktne zavisnosti mitohondrijskog metabolizma, a time i metabolizma ćelije, od koncentracije Ca^{2+} u matriksu, svako narušavanje mitohondrijske Ca^{2+} -homeostaze u neuronima je povezano sa patogenezom i razvojem neurodegenerativnih bolesti. Otežano uspostavljanje elektrohemijskog gradijenta protona na mitohondrijskoj membrani u slučaju mitohondrijske encefalomiopatije, ometa ulazak Ca^{2+} u mitohondrije, što rezultira velikim padom proizvodnje ATP (Brini, 2003). Sličan rezultat nađen je i kod Hantingtonove bolesti, gde ugradnja mutiranog proteina hantingtina snižava potencijal mitohondrijske membrane,

čime se smanjuje kapacitet mitohondrija za Ca^{2+} (Panov i sar., 2002). Nasuprot tome, mitohondrije u ćelijama optičkih nerava pogođenih Lederovom naslednom optičkom neuropatijom su oštećene i bubre usled prekomerne akumulacije Ca^{2+} (Fendyur i sar., 2004). U mitohondrijama nervnih ćelija pacijenata sa Parkinsonovom bolešću i amiotrofičnom lateralnom sklerozom, povećan nivo Ca^{2+} izaziva prekomernu sintezu izrazito toksičnih jedinjenja nazvanih reaktivne vrste kiseonika (*eng.* reactive oxygen species- ROS) (Fendyur i sar., 2004; Bowling i sar., 1993), dok se narušen metabolizam Ca^{2+} i sinteza ROS praćeni apoptotskim promenama javljaju i u Alchajmerovoj bolesti (Sheehan i sar., 1997).

Pored učestvovanja u brojnim specifičnim patofiziološkim procesima, mitohondrije imaju važnu opštu ulogu glavnog učesnika u procesu programirane ćelijske smrti, apoptozi. Relativno mala oštećenja mitohondrija pri kojima je zadržan približno normalan nivo sinteze ATP, uglavnom rezultiraju apoptotskom smrću ćelije, dok veća oštećenja praćena potpunim gubitkom ATP dovode do nekrotične ćelijske smrti. Ukratko, događaji tokom procesa apoptoze mogu se opisati na sledeći način: različiti citotoksični faktori uzrokuju inhibiciju elektron-transportnog lanca, što povećava produkciju slobodnih radikala i ROS, a to stimuliše ekspresiju gena za proapoptotski protein Bax. Bax interreaguje sa nekim komponentama spoljašnje membrane mitohondrija (tBid protein), ugrađuje se u nju i povećava njenu permeabilnost, što dovodi do oslobađanja prvenstveno citohroma c, u citosol. Citohrom c u citosolu aktivira grupu proteaza, koje nizom reakcija (nazvanim kaspazna kaskada) dovode do biohemijskih i morfoloških promena karakterističnih za apoptozu (Fiskum i sar., 2003).

S obzirom da se u ovom radu nameravamo baviti izučavanjem aktivnosti mitohondrijskih mehanizama za transport Ca^{2+} , treba posebno istaći da je već i sama povećana akumulacija Ca^{2+} u mitohondrijama bitan činilac koji dovodi do stimulacije sinteze ROS, oslobađanja citohroma c i pokretanja apoptotskih procesa, i to mehanizmima različitim od onih za Bax. Ca^{2+} nagomilan u matriksu, zajedno sa prisustvom ROS i slobodnih radikala dovodi do otvaranja mitohondrijskih tranzicionih pora. Kao rezultat njihovog otvaranja nestaje elektrohemijski gradijent protona, piridinski nukleotidi napuštaju matriks, zaustavlja se sinteza ATP, a zapremina matriksa se povećava usled osmotskog nagomilavanja vode (Soane i sar., 2007). Bubrenje mitohondrija se nastavlja sve do pucanja spoljašnje membrane i oslobađanja međumembranskih proteina uključujući citohrom c (Friberg i Wieloch, 2002). Oslobođeni citohrom c aktivira kaspaznu kaskadu i uvodi ćeliju u apoptozu (Brini, 2003). Ipak treba

napomenuti da se u novije vreme pojavio veći broj radova koji fiziološke i morfološke posledice aktivacije MTP opisuju kao korake ka nekrotičnoj, pre nego apoptotskoj, ćelijskoj smrti (Basso i sar., 2005; Nakagawa, 2005).

Na osnovu prethodnih poglavlja, u kojima je opisan značaj kalcijuma za normalno funkcionisanje nervnih ćelija, može se zaključiti da je svaki agens koji ostvaruje uticaj na mehanizme za transport Ca^{2+} i koncentraciju Ca^{2+} , kako u ćeliji tako i u njenim organelama, ujedno potencijalni neuromodulator. Rezultatima ranije dobijenim u našoj laboratoriji je pokazano, da je estradiol jedan od takvih agenasa, pa se istraživanjima u okviru ove doktorske teze nastavilo sa ispitivanjem potencijalne neuromodulatorne uloge tog značajnog steroidnog hormona.

3. Uticaj estradiola na CNS

Estradiol (17β -estradiol ili E2) pripada grupi steroidnih hormona koju čine šest hormonskih klasa: estrogeni, androgeni, glukokortikoidi, mineralokortikoidi, progestini i vitamin D. Radi se o složenim lipidnim molekulima, derivatima holesterola i eikosanoida, koji primarno nastaju u kori nadbubrežnih žlezda i polnim žlezdama. Dok je eikosanoid početno jedinjenje u sintezi kortizola i mineralokortikoida, estradiol nastaje transformacijom holesterola tokom niza složenih hemijskih reakcija. U poslednjem koraku tog biosintetskog puta estradiol nastaje iz testosterona pod dejstvom enzima aromataze. Estradiol je najzastupljeniji polni hormon u organizmu žena. Najvećim delom sintetišu ga granulosa-ćelije jajnika, dok se znatno manje količine sintetišu u kori nadbubrežnih žlezda, masnim ćelijama, ćelijama zida arterija i u mozgu.

Pored toga što ima ključnu ulogu u reprodukciji i regulaciji polnih funkcija, estradiol značajno utiče i na druge organske sisteme uključujući nervni sistem. Tako je tokom planiranja istraživanja u okviru ove doktorske teze, uzeta u obzir činjenica, da su rezultati ranije dobijeni u našoj laboratoriji ukazali na specifične modulatorne efekte estradiola u pojedinim (ekstrahipotalamičnim) regionima mozga. Nađeno je da estradiol utiče na aktivnost mehanizama za transport Ca^{2+} kroz plazma membranu nervnih završetaka (sinaptozoma) izolovanih iz hipokampusa (Hip), kaudalnog jedru (NC) i moždanog stabla (BS). S obzirom da

mitohondrije, kao što je već rečeno u ranijim poglavljima, takođe poseduju specifične Ca^{2+} -transportne mehanizme, smatrali smo da bi dobijene rezultate bilo opravdano upotpuniti ispitivanjima koja će se odnositi na modulatorne efekte estradiola na transport Ca^{2+} u mitohondrijama izolovanim iz sinaptozoma istih moždanih regiona. Ova ispitivanja bi imala poseban značaj u rasvetljavanju uticaja estradiola u pomenutim moždanim regionima, koji inače nisu direktno uključeni u kontrolu polno vezanih aktivnosti, niti je njihova funkcija primarno regulisna polnim hormonima.

U narednim poglavljima nešto više će biti rečeno o bitnim komponentama u ostvarivanju efekata estradiola na CNS: estradiolskim receptorima (ER), mehanizmima delovanja estradiola i njegovom neuroprotektivnom uticaju.

3.1 Estradiolski receptori (ER)

Micevych i Dominguez (2009) opisuju estradiolske receptore kao složene molekule koje prevode E2-signal u odgovarajući ćelijski odgovor (Micevych i Dominguez, 2009). Do sada najbolje opisani estradiolski receptori su $\text{ER}\alpha$ i $\text{ER}\beta$ (pripadnici jedarne familije receptora), a sve veći broj radova govori o postojanju ER specifičnih za plazma membranu i mitohondrije. Istovremeno, na nekim membranskim i mitohondrijskim proteinima koji primarno imaju različite fiziološke uloge, su detektovana tzv. estradiol-vezujuća mesta.

3.1.1. $\text{ER}\alpha$ i $\text{ER}\beta$

$\text{ER}\alpha$ i $\text{ER}\beta$ su ligand(hormon)-zavisni transkripcioni faktori u čijoj strukturi uočavamo tri funkcionala domena: ligand-nezavisni AF1 (eng. activation function) domen koji se nalazi na N-kraju i koji se aktivira fosforilacijom nakon aktivacije signalnih kinaza, AF2 domen koji je ligand-vezujuće mesto locirano na C-kraju i čija aktivacija direktno zavisi od vezivanja hormona, kao i DNA-vezujući domen koji prepoznaje vezujuća mesta za estradiolske receptore na genima koje aktivira estradiol. Između DNA-vezujućih domena prisutnih na $\text{ER}\alpha$ i $\text{ER}\beta$ postoji visoki stepen homologije (>60%), dok je homologija u AF2 domenima gotovo potpuna (95%). Niska homolognost (16%) u AF1 domenima doprinosi postojanju brojnih izoformi $\text{ER}\alpha$ i $\text{ER}\beta$ (Nilsson i sar., 2001). Oba tipa receptora su detektovana u tiroidnoj žlezdi, epididimusu, kostima i mozgu (Couse i Korach, 1999; Nilsson i sar., 2001). $\text{ER}\alpha$ je dominantno prisutan u

bubrezima, mlečnim žlezdama, uterusu i hipofizi, dok je ER β najzastupljeniji u jajnicima, kardiovaskularnom sistemu, plućima, slezeni, timusu, hipokampusu i reproduktivnom sistemu mužjaka (Enmark i sar., 1997; Milner i sar., 2005). Razlikom u prisustvu i brojnosti ER α i ER β se objašnjava različitost u odgovoru pojedinih tkiva na prisustvo estradiola.

Na nivou ćelije je takođe konstatovano nejednako prisustvo ER α i ER β u pojedinim ćelijskim delovima. Oba tipa receptora su detektovana u citoplazmi, jedru, mitohondrijama i plazma membrani (Levin, 2005; Pedram i sar., 2006; Szego i sar., 2006; Dewing i sar., 2007). U jedarnoj frakciji osobito su zastupljeni ER α , pretežno uključeni u ostvarivanje genomskog odgovora na prisustvo estradiola, dok su u mitohondrijama brojniji ER β , čija bi uloga mogla biti da učestvuju u realizaciju brzih efekata E2 i/ili efekata zavisnih od transkripcije mitohondrijskog genoma (Yang i sar., 2003; Chen i sar., 2004; Yang i sar., 2009). Membranski ER α/β su najčešće vezani za membranski protein kaveolin-1, direktno ili posredstvom drugih molekula (Src, Sch). Zbog dinamičnih procesa izdvajanja i ugradnje, oni nisu brojčano stabilna populacija. Usled vezivanja estradiola dolazi do izmene konformacije i fosforilacije membranskih ER α/β . Jedna od pretpostavki je da se raskida veza ER sa membranskim proteinom kaveolin-1, aktiviraju se receptori spregnuti sa G proteinom (GPCR) i započinje internalizacija, proces zatvaranje ER unutar vezikula, endosoma. Kretanjem endosoma dolazi do translokacije estradiolskih receptora unutar ćelije i dopremanja estradiola do ciljnih mesta. Nakon disocijacije E2, oslobođeni receptori se degraduju ili se vraćaju do membrane. Za njihovu ponovnu ugradnju u membranu neophodno je vezivanje palmitata (membranskog lipida) za cisteinske nastavke u AF2 domenu, nakon čega estradiolski receptor može stvarati komplekse sa membranski vezanim proteinima (kaveolin-1, Src, Sch, PI3K, tirozin-kinaza i dr.) (Marino i sar., 2006).

3.1.2. Drugi membranski (mER) i mitohondrijski (mtER) receptori za estradiol

Još uvek nije razjašnjeno da li su membranski i mitohondrijski receptori za estradiol derivati ER α/β ili predstavljaju zasebne članove porodice estradiolskih receptora (Christian i Morris, 2002). Sve su brojniji radovi koji opisuju efekte koje estradiol postiže vezivanjem za mitohondrijske i membranske receptore kodirane sa gena različitih od onih za ER α/β (Toran-Allerand, 2005; Qiu i sar., 2003; Qiu i sar., 2006). Tako Shughrue i saradnici nalaze vezivanje ¹²⁵I-estradiola u hipotalamusu i amigdali ER $\alpha^{-}/ER\beta^{-}$ miševa tj. miševa sa „isključenim“ (*eng.*

knockout) genima za ER α / β , što ukazuje na postojanje estradiolskih receptora koji nisu kodirani sa tih gena (Shughrue i sar., 2002). Šta više, nađeni su i efekti E2 na sinaptičku transmisiju u mozgu ER α ^{-/-}/ER β ^{-/-} životinja (Fugger i sar., 2001; Dominguez-Salazar i sar., 2006). Na membranama ćelija mozga i uterusa miša, Toran-Allerand nalazi 62-63 kDa protein neosetljiv na ICI 182,780, koji osim 17 β -estradiola vezuje i 17 α -estradiol, zbog čega zaključuje da se radi o novom receptoru različitom od ER α i ER β , i naziva ga ER-X (Toran-Allerand, 2005). Do sličnih rezultata se došlo i istraživanjima na ćelijama pluća (Pappas i sar., 1995). Još jedan primer novog estradiolskog receptora je STX-vezujući protein (STX je komponenta difenilakrilamida) detektovan u hipotalamusu. Ovaj protein je stereospecifičan za estradiol, inhibira ga ICI 182,780, a STX-inducibilnu signalnu ulogu zadržava i u ER α ^{-/-}/ER β ^{-/-} jedinkama (Qiu i sar., 2006)

3.1.2.1. Estradiol-vezujuća mesta

Pored toga što se vezuje za estradiolske receptore, estradiol se može vezati i za neke proteinske elemente u sastavu ćelijskih membranskih struktura, koji imaju primarno drugu fiziološku ulogu. Ramirez i saradnici (2001) su primenom E-BSA ustanovili da je OSCP (oligomicin-senzitivna) subjedinica kompleksnog mitohondrijskog enzima F₁F₀-ATP sintaze/ATPaze estradiol-vezujuće mesto (Kipp i Ramirez, 2001). Isti tim je našao još dva takva mesta: membransku gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) i β -tubulin (Ramirez i sar., 2001). Vezujuća mesta za estradiol su i membranski orfanski receptor (receptor spregnut sa G proteinom (GPCR 30)), koji posreduje u aktivaciji Ca²⁺ i PI3K signalnih puteva (Revankar i sar., 2005), kao i serin fosfataza, koja je imunohemijski, strukturno i funkcionalno sasvim različita od poznatih ER (Rao, 1998).

3.2. Mehanizmi delovanja estradiola

U višestrukome odgovoru CNS-a na prisustvo estradiola razlikujemo izmene nervnih aktivnosti do kojih dolazi neposredno nakon izlaganja hormonu (rani efekti) i one koje nastaju tek sa izvesnim vremenskim zaostatom u odnosu na prisustvo hormona (kasni efekti). Posebnu grupu efekata čine oni koje estradiol ostvaruje u uslovima oksidativnog stresa, kada zahvaljujući svojim oksidoreduktivnim osobinama molekuli hormona neutrališu nagomilane

slobodne radikale i ROS. U nastavku ćemo prvo govoriti o tzv. kasnim efektima estradiola jer su oni bili prvi uočeni i opisani.

3.2.1. Kasni efekti estradiola

Radi se o efektima koji kao krajnji odgovor na prisustvo estradiola imaju sintezu proteina *de novo*. Do njih dolazi kada mali molekuli E2 slobodnom difuzijom uđu u ćeliju i vežu se za ER prisutne u citoplazmi. Ligandom-aktivirani receptor se dimerizuje i transportuje u jedro gde se veže za ERE (eng. estrogen-response-enhancer) elemente u ciljnim genima i stimuliše njihovu transkripciju. Novonastala mRNA interreaguje sa ribozomima proizvodeći specifični protein koji je krajnji rezultat genomskog delovanja estradiola (Klinge, 2000; Vasudevan i Pfaff, 2008). Zbog vremena potrebnog za pokretanje transkripcione mašinerije kasni uticaji se ostvaruju sa izvesnim vremenskim zaostatkom, ali im zato produženo prisustvo produkata genske transkripcije omogućava dugotrajniji efekat. Delujući na ovaj način E2 u CNS-u reguliše aktivnosti: gena za progesteronski receptor, gena za BDNF (eng. brain derived growth factor) i njegove receptore, gena za antiapoptotski faktor Bcl-2, gena za oksitocinski receptor i gena za preproenkefalin (prekursor enkefalina) (Vasudevan i Pfaff, 2008). U hipotalamusu, regionu direktno odgovornom za polnu diferencijaciju i reprodukciju, aktivnost gena koje aktivira estradiol dovodi do elektrofizioloških promena, regulacije sinteze neuropeptida i aktivnosti sistema sekundarnog glasnika, indukcije oksitocinskih i prolaktinskih receptora, kao i regulacije sinaptogeneze. U novije vreme sve više se istražuje na hipokampusu, gde je zapažen genomski uticaj E2 na sinaptogenezu tj. na formiranje i raskidanje sinaptičkih veza tokom procesa učenja i pamćenja (McEwen, 2001).

Pored toga što ligandom-aktivirani estradiolski receptori aktiviraju pojedine gene ćelijskog genoma, oni ulaze i u mitohondrije gde se vezuju za promotore gena koje aktivira estradiol na mitohondrijskoj DNA (geni za I, II i III subjedinicu citohrom oksidaze) i pokreću njihovu transkripciju (Chen i sar., 2004).

3.2.2. Rani efekti estradiola

Rani efekti estradiola ne zahtevaju aktivaciju genske transkripcije, zato su brzi u nastanku (< 5 min) i izrazito privremeni po trajanju. Uglavnom traju samo koliko i prisustvo hormona (~1-4 h) (Behl i Manthey, 2000; Micevych i Dominguez, 2009). Do njih dolazi

vezivanjem E2 za membranski locirane ER ili za estradiol-vezujuća mesta nekih membranskih kinaza, fosfataza i jonskih kanala (Bourque i sar., 2009). Vezivanje E2 dovodi do fosforilacije i aktivacije enzima (tirozin kinaze, MAPK i PI3K), stimulacije sinteze cikličnog AMP, modulacije protoka jona kroz membranu i porasta $[Ca^{2+}]_i$; što sve zajedno aktivira puteva signalne transdukcije (Wong i sar., 2002; Schiff i sar., 2003; Warner i Gustafsson, 2006). Da je membrana primarno mesto nastanka brzih efekata uglavnom se dokazuje primenom estradiola vezanog za velike molekule kao što su albumin iz goveđeg seruma i peroksidaza iz rena (E-BSA i E-HRP) jer tako vezani E2 ne može proći kroz ćelijsku membranu i nedostupni su mu estradiolski receptori prisutni u citoplazmi (Vasudevan i Pfaff, 2008).

Od ranih efekata među najznačajnije se mogu ubrojiti uticaj na nadražljivost neurona, formiranje dendritskih grana i neuroprotekciju (Vasudevan i Pfaff, 2008). U hipotalamusu E2 smanjujući efikasnost GABA- i μ -opoidnog receptora, usporava protok K^+ i sprečava hiperpolarizaciju ćelija (Kelly i sar., 2002), dok u CA1 ćelijama hipokampusa, delujući preko NMDA-receptora i receptora spregnutih sa G proteinom, E2 povećava koncentraciju unutarćelijskog Na^+ i snižava koncentraciju vanćelijskog K^+ , dovodeći do depolarizacije ćelije (Kow i sar., 2006). U hormon-osetljivim regionima mozga kao što su hipotalamus, hipokampus i amigdala, E2 podstiče rast dendritskih grana (Flanagan-Cato i sar., 2001). O negenomskom karakteru ovog uticaja govori aktivacija nekoliko kinaza: PKA, PKB, phospho-CREB i PSD-95. U neuronima moždane kore Linford i Dorsa su našli inhibiciju izlaska Ca^{2+} iz endoplazmatičnog retikuluma delovanjem estradiola preko ER prisutnih u citosolu (Linford i Dorsa, 2002). Chaban i saradnici su pokazali da do porasta koncentracije Ca^{2+} u astrocitima dolazi usled stimulacije izlaska Ca^{2+} iz endoplazmatičnog retikuluma delovanjem estradiola na kanale koje otvara inositol-1,4,5,-trifosfat (Chaban i sar., 2004). U humanim SK-N-SH neuroblastoma ćelijama E2 inhibira mitohondrijski Ca^{2+} uniporter i sprečava pretereni porast koncentracije Ca^{2+} u matriksu (Wang i sar., 2006), dok u CA1 piramidalnim neuronima hipokampusa E2 sprečava porast koncentracije Ca^{2+} u citosolu i hiperpolarizaciju ćelije inhibicijom izlaska Ca^{2+} iz ćelijskih organela (Kumar i Foster, 2002). Istraživanjima u našoj laboratoriji je pokazano da se estradiol vezuje za mitohondrije izolovane iz nervnih završetaka celog mozga ženki pacova, kao i da smanjuje izlazak Ca^{2+} iz mitohondrija prethodno napunjenih sa Ca^{2+} . Do smanjenog izlaska Ca^{2+} dolazi usled inhibicije aktivnosti

mitohondrijskog $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača i porasta njegovog afiniteta za Na^+ (Horvat i sar., 2000; Horvat i sar., 2001).

Neki primarno rani efekti estradiola se u narednim koracima ukrštaju sa kasnim (genomskim odgovorom) (Barnes i sar., 2004; Levin, 2005; Vasudevan i Pfaff, 2008). Primer je uticaj E2 preko protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK), enzima prvenstveno vezanog uz mikrotubule. Vezivanje E2 za receptore (različite od $\text{ER}\alpha/\beta$) dovodi do fosforilacije i aktivacije MAPK. U sledećem koraku aktivirana MAPK reguliše sa jedne strane nivo i aktivnost širokog spektra transkripcionih faktora (C-myc, C-Fos, CREB) a sa druge fosforilacijom ribozomalnih proteina utiče na translaciju iRNA (Bourque i sar., 2009). Na taj način estradiol preko MAPK reguliše transkripciju gena važnih za normalan tok ćelijskog ciklusa.

Dakle, iako se mogu razlikovati rani i kasni (genomski i ne-genomski) efekti estradiola, mora se istaći da između njih postoji međuzavisnost i sinergizam u regulaciji ćelijskih funkcija (Chaudry i Yu, 2009).

3.2.3. Oksido/reduktivni krug estradiola

Poseban uticaj na funkcije CNS-a, estradiol ostvaruje zahvaljujući svom antioksidativnom potencijalu. U neuronima oštećenim ozledama, bolestima ili zapaljenskim procesima, dolazi do stanja oksidativnog stresa koje je okarakterisano akumulacijom izuzetno reaktivnih jedinjenja nazvanih slobodni radikali, kiseoničke (ROS) i azotne reaktivne vrste (RNS). Zbog posedovanja nesparenih elektrona, molekuli ovih jedinjenja teže postizanju energetske stabilnosti tako što velikom brzinom oduzimaju elektrone ili H^+ drugim molekulima, kao što su ćelijski lipidi, nukleinske kiseline i proteini. Molekuli E2 u svom fenolskom A prstenu imaju hidroksilnu grupu koja se ponaša kao donor jona H^+ . ROS preuzimaju H^+ od E2 i prelaze u redukovano stanje čime se neutrališe njihova reaktivnost. Nakon toga pod uticajem askorbinske kiselina, glutaciona ili NAD(P)H, oksidovani E2 biva redukovani i vraćen u prvobitno stanje, čime se kontinuirano obnavlja njegov antioksidativni potencijal. Dakle, zahvaljujući svom fenolskom A prstenu estradiol neutrališe ROS, sprečava oksidaciju ćelijskih lipida, proteina i DNA, a time i dezintegraciju ćelijske membrane i zaustavljanje ćelijskih funkcija (Behl i Manthey, 2002). Opisani oksido/reduktivni krug estradiola je prisutan i u nervnom tkivu, gde zajedno sa drugim ćelijskim antioksidativnim

mehanizmima služi u odbrani od oksidativnog stresa i sa njim povezane neurodegeneracije (Singh i sar., 2006).

3.3. Neuroprotektivni uticaji estradiola

Rezultati mnogih studija ukazuju na značajnu ulogu estradiola u neuroprotekciji, koja se ogleda u stabilizaciji nervnih funkcija, porastu vitalnosti neurona i sprečavanju njihovog odumiranja. Tako je pokazano da gubitak estradiola do koga dolazi supresijom funkcije jajnika agonistima gonadotropno-oslobađajućih hormona, hirurškim odstranjivanjem jajnika (ovarijektomija) ili prirodnim ulaskom u menopauzu, dovodi do slabljenja kognitivnih funkcija, memorije i motoričke koordinacije, kao i da su te negativne promene reverzibilne tj. odgovaraju na terapiju estradiolom (*eng.* estrogen replacment therapy-ERT) (McEwen, 2001). Tokom perimenopauze, menopauze i postmenopauze terapija estradiolom ublažava toplotne talase, usporava osteoporozu i ima kardioprotektivni efekat. U istim periodima ERT značajno smanjuje sklonost depresiji (Schmidt i sar., 1998), rizik od pojavljivanja Alchajmerove bolesti i oštećenja usled povrede mozga (Zandi i sar., 2002). Štaviše primena estradiola tokom prva tri sata od nastanka ozlede znatno smanjuje posledice moždanog infarkta (Behl i Manthey, 2002).

Neuroprotektivna uloga estradiola je pokazana i eksperimentima *in vitro*. Chowen i saradnici su našli da pikomolarne koncentracije E2 povećavaju preživljavanje hipotalamičkih neurona pacova gajenih u kulturi (Chowen i sar., 1992). Isti uticaj nalaze Singer i saradnici u kulturi primarnih kortikalnih neurona (Singer i sar., 1996). U oba slučaja radi se o delovanju estradiola preko aktivacije genoma. Sa druge strane antagonista estradiolskih receptora ICI 162,780 ne ometa povoljan uticaj E2 na preživljavanje i grananje ćelija u kulturi embrionalnih kortikalnih neurona, što ukazuje na efekat nezavisan od genske aktivacije. Nezavisno od genske aktivacije, E2 neuroprotektivno deluje i na kulturu neuroblastoma SK-N-SH ćelija (Green i sar., 1997), kao i na kulturu hipokampalnih HT22 ćelija koje ne poseduju jedarne receptore za estradiol (Green i sar., 1998). Ovakvo delovanje estradiola je od posebne važnosti jer omogućava brzu aktivaciju ćelijskih odbrambenih mehanizama, štiteći ćeliju u periodu do aktivacije kasnog (genomskog) odgovora.

3.3.1. Neuroprotekcija u neurodegenerativnim bolestima

Estradiol je povezan sa smanjenjem učestalosti, odgođenim nastankom, sporijim razvojem i boljim oporavkom od različitih neurodegenerativnih bolesti (Finch, 2005). Protektivni uticaj E2 je nađen u animalnim modelima najučestalijih neurodegenerativnih obolenja u ljudskoj populaciji: Parkinsonove bolesti (PB), Alchajmerove bolesti (AB), Hantingtonove bolesti (HB) i amiotrofne lateralne skleroze (ALS) (Morissette i sar., 2008; Carroll i Pike, 2008; Tunez i sar., 2006). U ćelijama pogođenim Alchajmerovom bolešću, E2 sprečava hiperfosforilaciju tau proteina, važnog gradivnog elementa mikrotubula, a time i agregaciju mikrotubula i narušavanje transportnih procesa u aksonu. Stimulacijom sinteze apolipoproteina, E2 ubrzava transport lipida i njihovu ugradnju u ćelijske membrane, što doprinosi bržem uklanjanju oštećenja i regeneraciji neurona (Struble i sar., 2007), dok stimulacijom antiinflamatornog proteina PPAR, E2 inhibira zapaljenske procese tokom progresije AB (Valles i sar., 2010). Aktivacijom estradiol-inducibilnih gena u regionima odgovornim za sintezu dopamina (u supstancia nigra), E2 ostvaruje neuroprotektivni efekat, koji se ogleda u poboljšanju motoričkih i kognitivnih funkcija kod animalnih modela obolelih od Parkinsonove bolesti (Saunders-Pullman i sar., 1999, Latourelle i sar., 2010). U animalnim modelima Hantingtonove bolesti, E2 stimuliše aktivnost sukcinat dehidrogenaze, sprečava oksidativni stres i ćelijsku smrt (Tunez i sar., 2006), a u motornim neuronima pogođenim amiotrofnom lateralnom sklerozom, E2 inhibira oksidativni stres i apoptozu stimulacijom ekspresije gena i aktivnosti važnog antioksidativnog enzima, superoksid dismutaze (Gottipati i Cammarata, 2008). Kod eksperimentalnih animalnih modela oštećenja mozga (ishemija, infarkt), E2 regulacijom molekula uključenih u zapaljenske procese i procese ćelijske smrti sprečava gubitak neurona i narušavanje kognitivnih funkcija (Brinton, 2005; DonCarlos i sar., 2009). U neuronima hipokampusa, E2 aktivacijom L-tipa Ca^{2+} -kanala dovodi do brzog ulaska Ca^{2+} u citosol što ima za posledicu aktivaciju ERK kinaze i povećanu ekspresije antiapoptotskog proteina Bcl-2 (Wu i sar., 2005).

3.3.2. Uticaj estradiola na mitohondrije

Bitan deo neuroprotektivnih efekata estradiola se ostvaruje uticajem na neke važne mitohondrijske funkcije.

3.3.2.1. Estradiol i oksidativni stres

U poglavlju Uvod. 3.2.3. već je bilo reči o mehanizmu kojim estradiol neutrališe visoko reaktivne molekule ROS, međutim neutralizacija ROS nije i jedini efekat kojim estradiol utiče na nastanak i posledice oksidativnog strasa.

U slučaju smanjenog priliva krvi (ishemija) u CNS, dolazi do inhibicije mitohondrijske oksidativne fosforilacije i sinteze ATP. Sa jedne strane mitohondrije više ne mogu odgovoriti na visoke energetske zahteve nervnih ćelija, dolazi do inaktivacije transmembranskih ATPaza, a time i osmotskog kolapsa mitohondrija i ćelije, a sa druge strane zbog narušenih mitohondrijskih funkcija raste produkcija slobodnih radikala i ROS, nastaje oksidativni stres i smanjuje se preživljavanje neurona (Simpkins i sar., 2009). Protektivni uticaj estradiola na mitohondrije odnosi se kako na porast efikasnosti sistema za odbranu od slobodnih radikala i ROS, tako i na paralelnu stimulaciju mitohondrijske energetske efikasnosti. Estradiol modulacijom ekspresije i aktivnosti antioksidativnih enzima zaustavlja akumulaciju ROS (Borras i sar., 2003), kao što su pokazali Pedram i saradnici za važan antioksidativni enzim, MnSOD (Pedram i sar., 2006a). Istovremeno, E2 stimuliše aktivnost citohrom c oksidaze (enzima oksidativnog metabolizma) i kretanje elektrona duž elektron-transportnog lanca, te na taj način ubrzava oksidativnu fosforilaciju i sintezu ATP-a (Nilsen i Brinton, 2004).

3.3.2.2. Metabolizam Ca^{2+}

Oksidativni stres značajno utiče i na mitohondrijski i ćelijski metabolizam Ca^{2+} . U uslovima oksidativnog stresa, zbog oštećenja ćelijskih membranskih struktura, raste koncentracija Ca^{2+} u citosolu, a unutarnja mitohondrijska membrana postaje neselektivno propusna i gubi se $\Delta\Psi_m$. Sve to zajedno uzrokuje gubitak ćelijske Ca^{2+} -homeostaze i otvara put nastanka neurodegenerativnih promena (LaFerla, 2002). Stimulacijom pohranjivanja Ca^{2+} u mitohondrije i povećanjem tolerancije mitohondrija na porast koncentracije Ca^{2+} u matriksu, E2 ostvaruje neuroprotektivni efekat i sprečava oštećenja do kojih bi došlo usled narušavanja Ca^{2+} -homeostaze (Nilsen i sar., 2003; Nilsen i Brinton, 2004). Estradiol-stimulisani ulazak Ca^{2+} u mitohondrije je praćen privremenim padom $\Delta\Psi_m$, ali i očuvanom mitohondrijskom respiracijom i povećanom proizvodnjom ATP (Nilsen i sar., 2003; Nilsen i Brinton, 2004). Nađen je i uticaj E2 na mehanizme izlaska Ca^{2+} iz mitohondrija. Inhibicijom aktivnosti mitohondrijskog Na^+/Ca^{2+} -izmenjivača, estradiol dovodi do porasta koncentracije Ca^{2+} u sinaptosomalnim mitohondrijama mozga pacova (Horvat i sar., 2000; Horvat i sar., 2001). Kao

što je ranije rečeno u poglavlju Uvod 2.1., povišena $[Ca^{2+}]_m$ aktivira enzime uključene u proizvodnju ATP-a. Dakle, estradiol delujući na koncentraciju Ca^{2+} u mitohondrijskom matriksu, utiče na mitohondrijski metabolizam i produkciju energije u ćeliji.

3.3.2.3. Estradiol i apoptoza

Estradiol ima direktan uticaj na ulogu mitohondrija kao glavnih regulatora ćelijskih apoptotskih signala (Kroemer i Reed, 2000). Antiapoptotsko delovanje estradiola se odvija preko familije Bcl-2 proteina, koju čine pro- i antiapoptotski faktori, čija interakcija određuje usmeravanje ćelije ka životu ili smrti (Rau i sar., 2003; Gottipati i Cammarata, 2008). U prisustvu E2 dolazi do fosforilacije i izmene konformacije antiapoptotskog proteina Bcl-2 lociranog na spoljašnjoj mitohondrijskoj membrani. Nastale promene sprečavaju interakciju Bcl-2 sa proapoptotskim faktorima (Bax, Bad, Bid), pri čemu fosforilisani Bcl-2 deluje kao antioksidant, zaustavlja oslobađanje mitohondrijskog proapoptotskog faktora citohroma c i otvaranje mitohondrijskih tranzicionih pora (Nilsen i sar., 2007). Paralelan put uticaja estradiola na aktivnost mitohondrijskih apoptotskih faktora vodi preko enzima fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3-K). Vezivanje estradiola za receptore (različite od $ER\alpha/\beta$ jer ih ne inhibira $ER\alpha/\beta$ antagonist ICI 182,780) izaziva interakciju hormon/receptor kompleksa sa PI3-K što dovodi do fosforilacije i aktivacije Akt (proteini iz familije proteinskih serin kinaza koji se nazivaju još i proteinske kinaze B). Aktivirani Akt se brzo premeštaju u mitohondrije gde inaktiviraju i sprečavaju ugradnju u membranu proapoptotskih faktora Bax, Bad i kinaze 3β , istovremeno stimulušući ugradnju antiapoptotskog faktora Bcl-2. Na taj način E2 stabilise membransku strukturu i funkcionisanje mitohondrijskih signalnih puteva (Manning i Cantley, 2007). Osim opisanim mehanizmima, E2 inhibira apoptozu stimulacijom ekspresije gena za antiapoptotske proteine, čime se odnos pro- i antiapoptotskih faktora u mitohondrijama pomera u korist drugih (Nilsen i sar., 2007). Na taj način estradiol štiti mitohondrije, zaustavlja proces programirane ćelijske smrti i ostvaruje značajan neuroprotektivni efekat.

Na osnovu iznetih podataka mogao se steći uvid o značaju koji ima mitohondrijski transport kalcijuma u održavanju ukupne Ca^{2+} -signalizacije u nervnim ćelijama. Takođe, opisane osobine i načini delovanja, ukazuju na estradiol kao potencijalnog modulatora mitohondrijskih mehanizama za transport kalcijuma, a na taj način i ukupnih nervnih aktivnosti u CNS-u.

II CILJEVI RADA

Iako je vrlo dobro poznato da održavanje homeostaze Ca^{2+} , kao jednog od važnih preduslova normalne aktivnosti CNS-a, u mnogome zavisi od sposobnosti mitohondrija da primaju i otpuštaju Ca^{2+} , još uvek se nedovoljno zna o uticaju hormona na ovu važnu mitohondrijsku funkciju. Istovremeno postoji veliki broj radova koji opisuju neuromodulatornu ulogu ženskog gonadnog hormona, estradiola (E2), kao i pozitivne uticaje terapije estradiolom na oporavak od hroničnih i akutnih povreda CNS-a i njima izazvanih poremećaja moždanih funkcija. Takođe, rezultati ranije dobijeni u našoj laboratoriji su pokazali da E2, u fiziološkim koncentracijama, moduliše kako voltažno-zavisni ulazak tako i Na^+ -zavisni izlazak Ca^{2+} iz izolovanih nervnih završetaka (sinaptozoma). Ovaj efekat E2 ostvaruje vezujući se za sinaptozmalne plazma membrane i to vezivanje je specifično za određene moždane strukture. Na taj način je pokazano da estradiol utiče na koncentraciju Ca^{2+} u citosolu.

Imajući u vidu pomenuto, istraživanja u okviru ove doktorske teze smo osmislili sa ciljem da se ispita uloga i mehanizmi delovanja estradiola u regulaciji transporta Ca^{2+} u sinaptozomalnim mitohondrijama izolovanim iz različitih ekstrahipotalamičnih regiona mozga ženki pacova (hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla).

- Da bismo proverili da li su naši preparati sinaptozomalnih mitohondrija izolovani iz ovarijektomisanih (OVX) ženki pacova podesan materijal za predviđena ispitivanje *in vitro* efekata estradiola:
 - a) ispitaćemo njihovu prečišćenost primenom različitih inhibitora i praćenjem aktivnosti mitohondrijskog enzima F_0F_1 -ATPaze.
 - b) proverom koncentracije E2 u serumu OVX životinja, isključićemo mogućnost uticaja endogeno prisutnog E2.
- Da bismo odredili da li estradiol utiče direktno na aktivnost mitohondrijskih mehanizama za transport Ca^{2+} :
 - a) merićemo ulazak Ca^{2+} kroz rutenijum red-osetljivi uniporter (RU) u mitohondrije izolovane iz nervnih završetaka navedenih regiona mozga, pod delovanjem E2 *in vitro*.
 - b) s obzirom da aktivnost RU zavisi od potencijala mitohondrijske membrane ($\Delta\Psi_m$), ispitaćemo i mogućnost indirektnog uticaja E2 na ulazak Ca^{2+} u sinaptozomalne mitohondrije delovanjem E2 na $\Delta\Psi_m$.
 - c) odredićemo Na^+ -zavisni izlazak Ca^{2+} iz izolovanih sinaptozomalnih mitohondrija posredstvom aktivnosti Na^+/Ca^{2+} -izmenjivača, u kontrolnim uslovima i u prisustvu E2 *in vitro*.
- U cilju bližeg određivanja mehanizama delovanja estradiola na transport Ca^{2+} ispitaće se:
 - a) da li postoji specifično vezivanje E2 za izolovane sinaptozomalne mitohondrije iz različitih moždanih regiona i odrediti kinetički parametri tog vezivanja.
 - b) da li E2 svoj efekat ostvaruje posredstvom vezujućih mesta u mitohondrijskoj membrani i/ili posredstvom mitohondrijskih $ER\alpha$ i $ER\beta$.

Smatramo da će dobijeni rezultati doprineti boljem upoznavanju puteva kojima estradiol reguliše mitohondrijski transport Ca^{2+} , a potencijalno i ukupnu Ca^{2+} -homeostazu u različitim regionima mozga ženki pacova.

III MATERIJAL I METODE

1. Hemikalije

U ovom radu su korišćene hemikalije p. a. stepena čistoće.

Obeleženi kalcijum ($^{45}\text{CaCl}_2$), specifične aktivnosti 23.57 mCi/mg i omnifluor nabavljeni su od firme PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, USA. Obeleženi (^3H)estradiol, specifične aktivnosti 94.0 Ci/nmol, nabavljen je od Amersham International plc., Little Chalfont, UK. Nitrocelulozni filtri, veličine pora 0.45 μm , nabavljeni su od firme Whatman, Dassel, Germany.

Od firme Sigma Chemical Company, St. Louis, USA, nabavljeni su: 17 β -estradiol (E2), rutenijum red (RR), goveđi serum albumin (BSA), E2 vezan za goveđi serum albumin (E-BSA), natrijum dodecil sulfat (SDS), Tween-20, saharoza, natrijum fluorid, β -merkaptotanol, etilendiaminotetrasirćetna kiselina (EDTA), akrilamid, bisakrilamid i folin.

Antitela korišćena u Western blot analizi: zečije poliklonsko antitelo na estradiolski receptor α , zečije poliklonsko antitelo na estradiolski receptor β i sekundarna HRP (horse-Radish Peroxidase) obeležena antitela su produkti firme Santa Cruz Biotechnology, USA, dok je mišje monoklonsko antitelo na protein toplotnog šoka 70 (HSP 70) proizvod firme Cell

Signaling, USA. Polivinil-flourid (PVDF) membrane veličine pora 0.45 μm , korišćene za imunobloting, nabavljene su od firme Amersham Biosciences, New Jersey, USA.

Specifični agonista ER α , 4,4,4-(Propil-(1*H*)-pirazol-1,3,5-tril)trifenol (PPT); specifični agonista ER β , 2,3-bis(4-Hidrofenil)-propionitril (DPN); neselektivni antagonist ER α i ER β , 7 α ,17 β -(9((4,4,5,5,5-pentafluoropentil)nonil)estra-3,5(10)-trien-3,17-diol (ICI 182,780), inhibitor mitohondrijskog Na⁺/Ca²⁺-izmenjivača 7-Hloro-5-(2-hlorofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3*H*)-one (CGP 37157) i inhibitor oksidativne fosforilacije u mitohondrijama karbonil cijanid 4-(trifluorometoksi)fenilhidrazon (FCCP) nabavljeni su od firme Tocris Cookson, Bristol, UK.

Za analizu koncentracije estradiola u serumu korišćen je ELISA kit specifičan za E2, EIA Estradiol Test Kit, Bio Check, Inc., Foster City, USA.

Od firme Molecular Probes, Eugene, USA nabavljen je rodamin 123 (RH 123).

Sve ostale hemikalije nabavljene su od firmi Merck, Darmstadt, Germany ili ICN Biomedicals, Silverado, USA.

2. Životinje

U eksperimentima su korišćene ženke albino pacova Wistar soja. Životinje su gajene na farmi Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ u standardnim laboratorijskim uslovima, na temperaturi od 22 °C, pri vlažnosti 55% i veštačkom osvetljenju od 7-19 sati i imale su slobodan pristup hrani i vodi.

Za potrebe eksperimenata, životinje su bilateralno ovarijektomisane (OVX), pod etarskom narkozom, tri sedmice pre žrtvovanja.

Rad sa eksperimentalnim životinjama je odobren od strane etičkog komiteta Srpskog udruženja za upotrebu životinja u istraživanju i obrazovanju (rešenje br. 15/06 od 22.05.2006.).

2.1 Priprema tkiva

Životinje su žrtvovane dekapitacijom pomoću giljotine (Harvard Apparatus) u jutarnjim časovima. Izolovani mozgovi su ispirani u 0.32 mol/l saharozi, 1 mmol/l EDTA, 10 mmol/l Tris- HCl, pH 7.4 (izolacioni medijum, IM) i moždani regioni su izolovani na ledu. Izolovana

su cela moždana stabla (BS) koja se nalaze ispod malog mozga, hipokampus (Hip) koji se nalazi dorzolateralno u mozgu i deo jedra kaudatusa putamena (NC) u predelu mozga 3 mm od mirisnog režnja do hipokampusa.

Mozgovi i moždani regioni izolovani iz 6-12 životinja (u zavisnosti od eksperimenta) su spajani i homogenizovani u IM u staklenom homogenizeru sa teflonskim klipom (zazor između klipa i homogenizara je 0.20 mm), klip se obrtao brzinom 900 rpm uz podizanje i spuštanje dvadeset puta.

Priprema tkiva je rađena na temperaturi 4°C.

2.2. Izolovanje sinaptozoma

Za ispitivanja transporta Ca^{2+} korišćeni su sinaptozomi (izolovani nervni završeci) dobijeni iz Hip, NC i BS mozga OVX ženki pacova primenom metode Cotman-a i Matheus-a (1971) koja predstavlja modifikaciju metode Whittaker-a i Gray-a (1962)

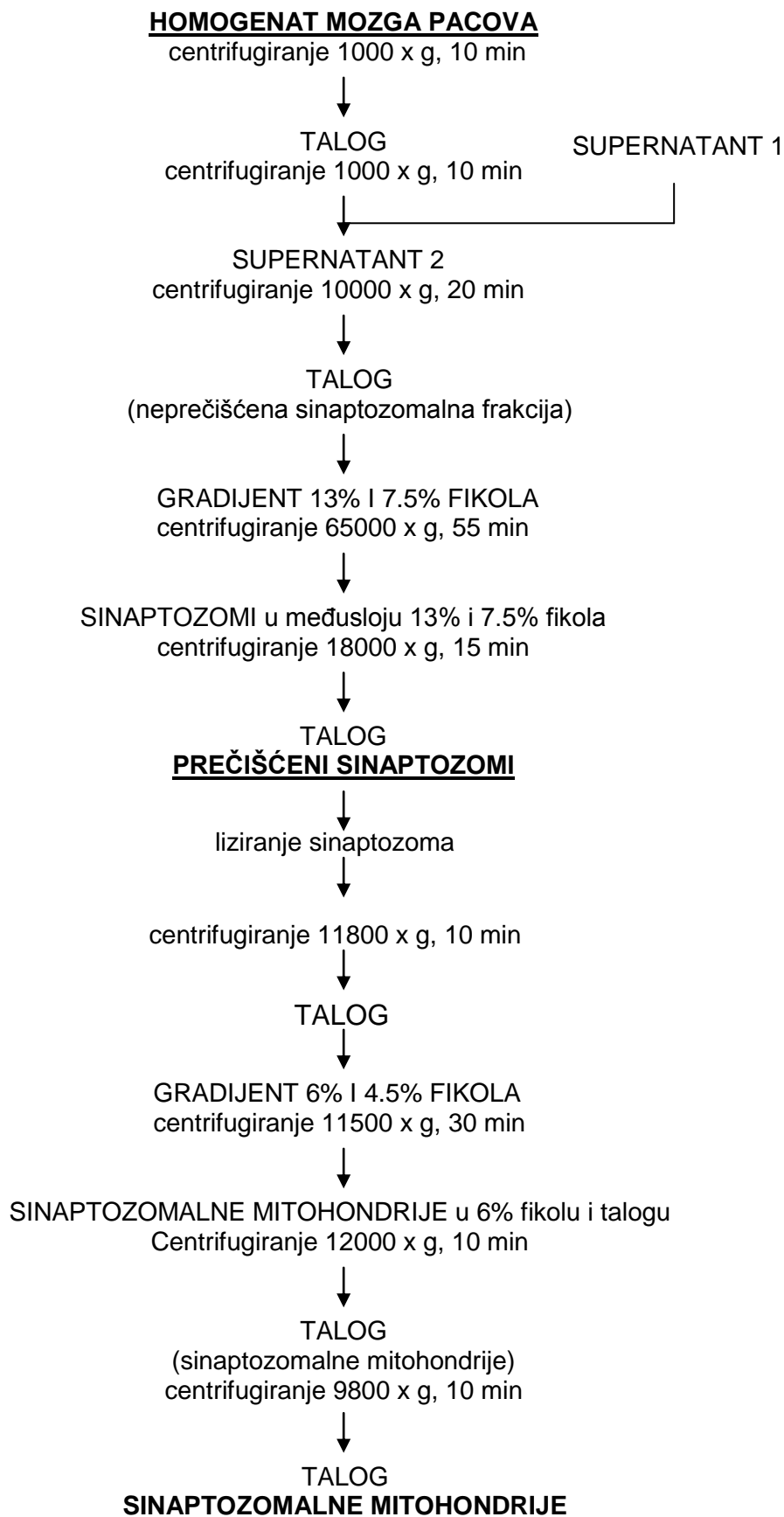
Homogenat tkiva, pripremljen kako je opisano u prethodnom poglavlju, se centrifugira na 1000 x g tokom 10 min u Sorvall centrifugi. Supernatant se izdvoji, a talog se ispiri sa 10 ml IM i centrifugira pod istim uslovima. Supernatanti se spoje i centrifugiraju na 10 000 x g tokom 20 min. Na ovaj način se taloži neprečišćena sinaptozomalna frakcija (P_2) u kojoj se nalaze sinaptozomi i mitohondrije. Talog se resuspenduje u 3 ml IM i nanosi na diskontinualni fikolski gradijent koji se sastoji od 13%- i 7.5%-tnog rastvora fikola. Fikol se rastvara u puferu sastava: 0.32 mol/l saharoza, 50 μ mol/l EDTA, 10 mmol/l Tris-HCl pH 7.4. Gradijenti se centrifugiraju 55 min brzinom od 65 000 x g u rotoru SW Ti 41, u ultracentrifugi Beckman L5-65. Prečišćeni sinaptozomi prikupljeni u interfazi fikolskog gradijenta se izdvajaju, a zatim ispiraju i talože u 25 ml IM centrifugiranjem 15 min pri 18 000 x g u Beckman J2-21 centrifugi, Shema 1.

2.3. Izolovanje sinaptozomalnih mitohondrija

Mitohondrije se izoluju iz sinaptozoma prema metodi Markwell-a i sar. (1978) koja predstavlja modifikaciju metode Lai i Clark-a (1970).

Sinaptozomi se liziraju dodavanjem 3 ml 5 mmol/l Tris-HCl pH 7.4, zatim se vorteksuj 20 sekundi i ostave na -20°C preko noći. Nakon odmrzavanja, lizirani sinaptozomi se ručno homogenizuju u staklenom homogenizeru na ledu. Doda se 5 mmol/l Tris- HCl pH 7.4 do finalne zapremine od 20 ml. Ovako pripremljen uzorak se centrifugira na 11 800 x g 10 min u Beckman J2-21 centrifugi. Dobijeni talog se suspenduje u 10 ml 3%-tnog rastvora fikola i nanosi na diskontinualni gradijenti od 4.5%- i 6%-tnog rastvora fikola. (Fikol je rastvoren u medijumu: 0.24 mol/l manitol, 60 mmol/l saharoza, 50 µmol/l EDTA, 10 mmol/l Tris- HCl pH 7.4). 3%-ni rastvor fikola se pravi razblaživanjem 6%-tnog fikola dejonizovanom vodom u odnosu 1:1. Uzorak se centrifugira na gradijentu 30 min pri 11 500 x g u Beckman J2-21 centrifugi. Sinaptozomalne mitohondrije su u talogu i delu 6%-tnog fikola. Odstrani se 4.5%-tni i deo 6%-tnog fikola. Talog se pomeša sa preostalim 6%-tnim fikolom, dodaje se 15 ml IM i centrifugira pri 12 000 x g tokom 10 minuta u Beckman J2-21 centrifugi. Dobijeni mitohondrijski talog se suspenduje u 5ml IM i ispiru centrifugiranjem 10 min pri 9 800 x g u Beckman J2-21 centrifugi, Shema 1. Sinaptozomalne mitohondrije prikupljene u talogu se suspenduju u maloj zapremini 0.3 mol/l manitola i čuvaju do upotrebe na -20°C.

Svi postupci izolovanja sinaptozoma i sinaptozomalnih mitohondrija rađeni su na ledu (4°C).



Shema 1. Izolovanje sinaptozoma i sinaptozomalnih mitohondrija

3. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određivana po metodi Markwell-a i saradnika (1978) koja predstavlja modifikaciju metode Lowry-a i saradnika (1951). Ova metoda ne zahteva prethodnu solubilizaciju ili ekstrakciju lipida iz uzoraka.

Reagensi i rastvori koji se koriste u ovoj metodi su:

Reagens A: 2% Na₂CO₃ + 0.4% NaOH + 0.16% Na-tartarat + 1% SDS

Reagens B: 4% CuSO₄ x 5 H₂O

Reagens C: reagens A : reagens B = 100 : 1

Folin-Chicalteau-ov reagens (Sigma) razblažen sa dejonizovanom vodom 1 : 1

U 890 µl dejonizovane vode dodaje se 10 µl uzorka, čiju koncentraciju proteina određujemo, a zatim i 100 µl NaOH. Sadržaj epruvete se promeša i ostavi da stoji 10 min na sobnoj temperaturi (RT). Nakon toga, dodaje se 2 ml reagensa C, sadržaj se ponovo promeša i ostavi da stoji 15 min na RT. Na kraju se dodaje 300 µl Folin-Chicalteau-ovog reagens. Inkubacija traje 45 min na RT. Intenzitet razvijene boje tj. optička gustina, je očitavana na spektrofotometru (Boeco S-30) na talasnoj dužini 750 nm. Količina proteina je određivana iz standardne krive koja je napravljena sa BSA, po istom eksperimentalnom postupku po kome su određivani proteini u uzorcima.

4. Ispitivanje enzimske aktivnosti F₀F₁-ATPaze

Ispitivanje enzimske aktivnosti F₀F₁-ATPaze je rađeno na prečišćenim sinaptosomalnim mitohondrijama izolovanim iz celog mozga ženki pacova žrtvovanih u različitim fazama estrusnog ciklusa: proestrusu, estrusu i diestrusu, kao i iz OVX ženki. Postupak se zasniva na kolorimetrijskom određivanju koncentracije inorganskog fosfata (Pi), oslobođenog hidrolizom ATP-a prema modifikovanoj metodi Martinez-a i saradnika (1995).

Mitohondrije (0.2 mg/ml) su preinkubirane 5 min na 30°C u medijumu sastava: 10 mmol/l Tris-HCl pH 8.0 i 3 mmol/l MgCl₂, ukupne zapremine 0.3 ml. U smeši su bili prisutni i specifični ATP-azni i fosfatazni inhibitori: ouabain, NaF/teofilin, NaN₃ i oligomicin. Enzimska reakcija je pokretana dodavanjem 1.5 mmol/l ATP i trajala je 10 min, nakon čega je zaustavljena dodavanjem 55 µl 3 mol/l perhloracetatne kiseline i prenošenjem smeše na led.

Smeše su držane na ledu 15 min, a potom je rađena bojena reakcija za određivanje koncentracije Pi nastalog kao produkt enzimske aktivnosti F_0F_1 -ATPaze sa ATP kao supstratom, po metodi Pennial (1966).

Metoda se zasniva na reakciji između fosfata, amonijum molibdata i kalaj(II)-hlorida u kiseloj sredini. Kao proizvod ove reakcije nastaje kalaj-fosfomolibdatni kompleks plave boje. Postupak: Nakon završene enzimske reakcije u smešu (0.3 ml) se dodaju reagensi: 4.5 ml smeše izobutanol : benzen 1 : 1, 0.75 ml 1% amonijum-molibdata, 0.75 ml 0.28 mol/l sumporne kiseline. Smeša se vorteksuje 30 s i inkubira 45 min na RT. Tokom inkubacije dolazi do razdvajanja organskog i neorganskog sloja, odnosno do ekstrakcije oslobođenog fosfata. 1.5 ml organskog sloja se potom odvoji i u njega se dodaje 6 ml 3.4% H_2SO_4 u etanolu i 0.75 ml 0.5% $SnCl_2$ u 1.5 mol/l H_2SO_4 . Smeša se promeša i ostavi 45 min na RT, pri čemu dolazi do razvijanja boje.

Apsorbancija je merena spektrofotometrijski (spektrofotometar Boeco S-30) na talasnoj dužini od 700 nm, uz korišćenje rastvora kalijum-hidrogenfosfata kao referentnog standarda. Koncentracija Pi je očitavana sa standardne krive i korigovana je za blank tj. probe bez mitohondrija. Osetljivost metode je u opsegu 0.05-1.00 μ mol Pi/ml.

5. Enzimski imunoesej (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

5.1. Priprema seruma

Koncentracija E2 je određivana u serumu OVX životinja žrtvovanih tri sedmice nakon operacije. Krv je skupljana u polipropilenske epruvete, ostavljena da koaguliše na RT 30 min, nakon čega je centrifugirana 15 min na 3000 rpm (Sorvall GLC-3). Izdvojeni su serumi prikupljeni u supernatantu i odmah iskorišćeni za enzimski imunoesej.

5.2. Određivanje koncentracije estadiola u serumu

Koncentracija estradiola u serumu je merena esejem namenjenim za ljudski ili pacovski serum ili plazmu (EIA Estradiol Test Kit, Bio Check, Inc., Foster City, USA). Esej je odrađivan u mikroploči, u mraku, na sobnoj temperaturi. U bunariće na mikroploči stavljeno je

25 µl kalibratora (standard) ili seruma, dodano je sekundarno anti-zečje antitelo konjugovano sa proksidazom iz rena (HRP), 100 µl i zečije primarno atitelo na E2, 50 µl. Sadržaj je 30 s ručno mućkan nakon čega je usledila inkubacija 90 min. Ploča je zatim 5 put uzastopno ispirana vodom i dodan je hromogeni supstrat tetrametilbenzidin (TMB) koji dovodi do razvijanja boje. Smeša je promućkana i nastavljena je inkubacija narednih 20 min. Enzimaska reakcija je prekinuta dodavanjem 100 µl STOP rastvora (1 M HCl), nakon čega je apsorbancia očitavana na 450 nm na ELISA čitaču WALLAC 1420-Victor2 Multilabel Counter LKB, UK. Intenzitet boje je obrnuto proporcionalan koncentraciji E2 u uzorku. Vrednosti koje se očitavaju sa semilogaritamske standardne krive su izražene u pg/ml. Osetljivost enzimskog eseja je ~1 pg/ml, varijacije između merenja u okviru eseja bile su manje od 10%.

6. Transport Ca^{2+} u mitohondrijama

Transport Ca^{2+} je praćen u sinaptosomalnim mitohondrijama izolovanim iz hipokampusu (Hip), kaudalnog jedra (NC) i moždanog stabla (BS). Nakon odmrzavanja mitohondrija, određena je koncentracija proteina i odgovarajući alikvoti su korišćeni za praćenje transporta Ca^{2+} .

6.1. Ulazak Ca^{2+}

Ulazak Ca^{2+} u sinaptosomalne mitohondrije je praćen u kontrolnim uslovima, u prisustvu estradiola i u prisustvu inhibitora oksidativne fosforilacije, FCCP.

6.1.1. Ulazak Ca^{2+} u kontrolnim uslovima

Mitohondrije su preinkubirane 10 min na 22 °C u puferu MUM čiji je sastav: 300 mmol/l manitol, 1 mmol/l maleat, 10 mmol/l KCl, 10 mmol/l Tris-HCl pH 7.4. Ulazak Ca^{2+} je započinjao dodavanjem smeše 0.6-0.7 µCi $^{45}\text{CaCl}_2$ i 200 µmol/l CaCl_2 . Dodavanjem 2 ml 0.25 mol/l saharoze u eksperimentalnu smešu od 200 µl proces je zaustavljan. Iz svake smeše izdvajan je 1 ml i filtriran pod vakuumom na nitroceluloznom filtru, veličine pora 0.45 µm. Filtri su ispirani sa 2 puta po 3 ml 0.25 mol/l saharoze da bi se uklonio Ca^{2+} koji nije ušao u mitohondrije u toku inkubacije. Za određivanje ukupno dodatog aktiviteta, 20 µl iz svake

smeše je nanošeno na filter papir, bez filtracije. Filtri su sušeni i pakovani u vaje sa po 2 ml scintilacione tečnosti (4 g omni-fluora u 1 l touola), radi merenja radioaktivnosti na β -brojaču (scintilacioni spektrofotometar LKB Wallac, 1219 Rackbeta). Pri obradi dobijenih podataka uzeta je u obzir efikasnost brojača za $^{45}\text{Ca}^{2+}$ od 80% i blank filtra. Sve probe i totali rađeni su u triplikatu.

6.1.2. Uticaj estradiola na ulazak Ca^{2+}

U eksperimentima gde je ispitivan koncentraciono-zavisni efekat estradiola *in vitro* na ulazak Ca^{2+} u mitohondrije, mitohondrije (0.2 mg/ml) su preinkubirane u MUM, 10 min na 22 °C, a zatim u prisustvu E2 (10^{-12} - 10^{-5} mol/l) narednih 10 min. Ulazak Ca^{2+} je otpočinjao dodavanjem Ca^{2+} do finalne koncentracije 200 $\mu\text{mol/l}$ (0.6-0.7 μCi) i trajao je 5 min. Kao kontrolna vrednost za efekat E2 uzet je ulazak Ca^{2+} u mitohondrije izmeren u uzorcima bez hormona.

6.1.3. Efekat FCCP

Kada je praćen efekat FCCP na ulazak Ca^{2+} u mitohondrije, mitohondrije su preinkubirane 10 min na 22 °C u odsustvu ili prisustvu estradiola (5×10^{10} mol/l). Zatim je u polovinu uzoraka iz svake grupe (bez i sa E2) dodan FCCP (10^{-6} mol/l) i inkubacija je nastavljena narednih 3 min, nakon čega je dodavanjem Ca^{2+} do finalne koncentracije 200 $\mu\text{mol/l}$ (0.6- 0.7 μCi) iniciran ulazak Ca^{2+} u mitohondrije koji je trajao 5 min. Kao kontrolna vrednost za efekte E2 i FCCP uzet je ulazak Ca^{2+} u mitohondrije izmeren u uzorcima bez tih agenasa.

6.2. Na^+ -zavisni izlazak Ca^{2+}

Da bi se ispitao Na^+ -zavisni izlazak Ca^{2+} iz mitohondrija rađene su tri grupe eksperimenata. Prvom grupom praćen je izlazak u kontrolnim uslovima, drugom grupom ispitan je uticaj estradiola na aktivnost $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača (mtNCX), dok je eksperimentima trće grupe praćen izlazak Ca^{2+} u prisustvu agoniste i antagonista estradiolskih receptora.

6.2.1. Izlazak Ca^{2+} u kontrolnim uslovima

Da bi se ispitao izlazak Ca^{2+} u kontrolnim uslovima, mitohondrije (0.2 mg/ml) su preinkubirane u smeši ukupne zapremine 300 μl , 10 minuta na 22°C , a zatim punjene sa Ca^{2+} (200 $\mu\text{mol/l}$). Nakon 5 minuta ulazak je zaustavljan dodavanjem inhibitora kanala za Ca^{2+} , rutenijum red, do finalne koncentracije 0.01 mmol/l. Zatim je 100 μl uzorka filtrirano kroz nitrocelulozne filtre veličine pora 0.45 μm , da bi se odredila koncentracija Ca^{2+} koji je ušao u mitohondrije. U preostalih 200 μl dodavan je NaCl do finalne koncentracije 100 mmol/l, čime je otpočinjao Na^+ -zavisni izlazak Ca^{2+} iz mitohondrija koji je trajao 5 minuta. Zajedno sa NaCl u smešu je dodan EDTA (0.2 mmol/l) koji povećava izlazak Ca^{2+} . Proces je zaustavljan sa 2 ml hladne 0.25 mol/l saharoze 5 mmol/l EDTA. Filtracija i priprema filtra za merenje rađene su kao kod praćenja ulaska. Vrednost Na^+ -zavisnog izlaska je računata kao razlika količine Ca^{2+} koja je ušla u mitohondrije u toku inkubacije sa Ca^{2+} i količine Ca^{2+} koja ostaje u mitohondrijama nakon inkubacije sa NaCl + EDTA.

6.2.2. Uticaj estradiola na izlazak Ca^{2+}

Uticaj estradiola na aktivnost mitohondrijskog $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača je praćena u prisustvu različitih koncentracija Na^+ , u uslovima kao što je opisano u Materijal i metode 6.2.1. U smešu sa mitohondrijama prethodno napunjenim sa Ca^{2+} je dodavan NaCl do finalne koncentracije 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM i 300 mM, nakon čega je meren izlazak Ca^{2+} u kontrolnim uslovima i u prisustvu hormona.

Da bi se dodatno ispitao efekat estradiola na rad $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača, izlazak Ca^{2+} je praćen i u prisustvu inhibitora mtNCX, CGP 37157. Nakon što su u uslovima optimalnim za ulazak mitohondrije napunjene sa Ca^{2+} , dodan je rutenijum red, inkubacija je nastavljena narednih 10 min u prisustvu 5×10^{-10} mol/l estradiola. Nakon toga uzorci su podeljeni u dve grupe, prvoj grupi je dodavan CGP 37157 do finalne koncentracije 10^{-6} mol/l, dok je u drugu grupu uzoraka dodan samo DMSO (rastvarač u kom je pripremljen CGP 37157). Inkubacija je trajala 3 min nakon čega je dodavanjem 100 mmol/l NaCl i 0.2 mmol/l EDTA pokretan Na^+ -zavisni izlazak Ca^{2+} koji je trajao 5 minuta. Zaustavljanje reakcije, filtracija, priprema filtra za brojanje i obrada podataka rađeni su kao u eksperimentima za određivanje izlaska Ca^{2+} u kontrolnim uslovima, Materijal i metode 6.2.1.

6.2.3. Izlazak Ca^{2+} u prisustvu antagoniste i agonista estradiolskih receptora (ER)

Da bi se utvrdilo da li estradiol svoj efekat ostvaruje posredstvom vezujućih mesta u mitohondrijskoj membrani i/ili posredstvom mitohondrijskih $\text{ER}\alpha$ i $\text{ER}\beta$, rađene su tri grupe eksperimenata. U prvoj grupi eksperimenata, izlazak Ca^{2+} je praćen u prisustvu slobodnog estradiola ili estradiola vezanog za goveđi serum albumin, E-BSA. Mitohondrije su napunjene sa Ca^{2+} , a potom 10 min inkubirane sa 5×10^{-10} mol/l E2 ili sa E-BSA (u koncentraciji pri kojoj je koncentracija samog estradiola bila 5×10^{-10} mol/l). Zatim je dodavanjem 100 mmol/l NaCl i 0.2 mmol/l EDTA pokretan izlazak Ca^{2+} . Dalji sled postupaka bio je kako je prethodno opisano u Materijal i metode 6.2.1.

U drugoj grupi eksperimenata mitohondrije napunjene sa Ca^{2+} su pre dodavanja E2 ili E-BSA inkubirane 20 min u prisustvu 10^{-6} mol/l neselektivnog antagoniste estradiolskih receptora, ICI 182,780. Antagonista je dodavan u cilju sprečavanja vezivanja E2 za receptore. Zatim je dodavan E2 ili E-BSA i inkubacija je produžena narednih 10 min, nakon čega je pokretan izlazak Ca^{2+} . Dalji sled postupaka bio je kako je prethodno opisano u Materijal i metode 6.2.1.

U trećoj grupi eksperimenata mitohondrije napunjene sa Ca^{2+} su 10 min inkubirane sa ili bez E2, sa specifičnim agonistom $\text{ER}\alpha$, PPT (10^{-8} mol/l) ili sa specifičnim agonistom $\text{ER}\beta$, DPN (10^{-8} mol/l). Dalji sled postupaka bio je kako je prethodno opisano u Materijal i metode 6.2.1.

6.2.4. Određivanje kinetičkih karakteristika Na^+ -zavisnog izlaska Ca^{2+}

Kinetički parametri koji opisuju afinitet i kapacitet mitohondrijskog $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača za Na^+ , kako u kontrolnim uslovima tako i u prisustvu estradiola, određivani su iz Michaelis-Menten-ovog i Scatchard-ovog grafika. Vrednosti izlaska Ca^{2+} izražene su kao nmol Ca^{2+} /mg proteina, a izračunavane su iz razlike koncentracije Ca^{2+} izmerene u mitohondrijama pre i posle inkubacije sa Na^+ .

K_d , kao pokazatelj afiniteta mtNCCX za Na^+ i B_{\max} kao pokazatelj kapaciteta, određivani su iz nagiba prave linije dobijene Scatchard-ovom linearizacijom, odnosno prema vrednosti na kojoj linija preseca X-osu.

7. Praćenje potencijala mitohondrijske membrane ($\Delta\Psi_m$)

Ovi eksperimenti su rađeni da bi se ispitalo da li estradiol delovanjem preko potencijala mitohondrijske membrane može ostvarivati indirektan uticaj na ulazak Ca^{2+} u mitohondrije.

Praćenje $\Delta\Psi_m$ je rađeno na način kako je to opisano u radu Tang-a i Zhang-a (2005). Postupak se zasniva na činjenici da dodavanje izolovanih normalno dišućih mitohondrija u rastvor boje rodamina 123 (RH 123), dovodi do smanjenja fluorescence tog rastvora zbog ulaska boje u mitohondrije, dok se fluorescence ponovo pojačava kad boja izlazi iz mitohondrija usled narušavanja $\Delta\Psi_m$ (Emaus i sar., 1986).

Za potrebe ovih eksperimenata napravljen je rastvor RH 123, koncentracije 5×10^{-6} mol/l u medijumu MUM jer je to medijum koji je inače korišćen i u svim eksperimentima kada je praćeno vezivanje estradiola i transporta Ca^{2+} u mitohondrijama (sastav MUM-a odgovara sastavu drugih medijuma korišćenih pri merenjima $\Delta\Psi_m$). Po 100 μl rastvora rodamina 123 razliveno je u bunariće 8 x 12 crne mikroploče (Dynatech MicroFluor, USA) i odmah po razlivanju je izmerena fluorescence rastvora na 535 nm, pomoću uređaja Wallac 1420-Victor2 Multilabel Counter LKB, UK. Zatim je u svaki bunarić dodano 30 μg izolovanih prečišćenih mitohondrija suspendovanih u 10 μl 0.3 mol/l manitola. Nakon 5 min inkubacije uz lagano mućkanje ponovo je merena fluorescence na 535 nm. Određena je razlika fluorescence izmerene samo u rastvoru RH 123 i fluorescence kada su i mitohondrije prisutne u rastvoru.

U dvanaest bunarića je dodano 10 μl FCCP, do finalne koncentracije u bunariću 10^{-6} mol/l, i nakon 3 min inkubacije merena je fluorescence. U drugih dvanaest bunarića dodano je 10 μl estradiola (do finalne koncentracije 5×10^{-10} mol/l) i uzorci su inkubirani 10 min pre dodavanja FCCP. Zatim je izmerena fluorescence ovih uzoraka. Određena je razlika fluorescence u uzorcima sa i bez estradiola.

Svi eksperimenti su rađeni u mraku, na temperaturi 23°C.

8. Statistička analiza podataka

Uzorci su analizirani u triplikatu, u tri ili više ponavljanja. Dobijene vrednosti su izražene kao aritmetička srednja vrednost. Odstupanje pojedinačnih vrednosti od izračunate srednje vrednosti je dato kao standardna greška srednje vrednosti, S.E.M. Statistički značajne

razlike između vrednosti dobijenih za pojedine grupe uzorka su određivane korišćenjem jednofaktorijalne ANOVE (one way analysis of variance) i post hoc Tukey testom. Za vrednosti $p < 0.05$, razlike su smatrane statistički značajnim.

9. Vezivanje estradiola za sinaptosomalne mitohondrije

S obzirom da su raniji rezultati pokazali da bi vezivanje za mitohondrije mogao biti jedan od puteva preko kojih estradiol ostvaruje modulatorni uticaj na Ca^{2+} -transportne mehanizme, smatrali smo da je opravdano ispitati tu pretpostavku na našim preparatima sinaptosomalnih mitohondrija izolovanih iz Hip, NC i BS.

Eksperimenti su bili podeljeni u tri grupe. Prvom grupom eksperimenata praćeno je vezivanje (3H)estradiola (5×10^{-10} mol/l) za izolovane sinaptosomalne mitohondrije u zavisnosti od koncentracije mitohondrijskih proteina (0.05 mg/ml, 0.075 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.15 mg/ml, 0.25 mg/ml). U eksperimentima druge grupe, ispitivan je uticaj dužine trajanja (1 min, 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 45 min ili 60 min) inkubacije mitohondrija (0.2 mg/ml) sa (3H)estradiolom (5×10^{-10} mol/l) na vezivanje. U trećoj grupi eksperimenata mitohondrije (0.2 mg/ml) su inkubirane 10 min sa različitim koncentracijama (3H)estradiola (10^{-10} mol/l, 1.5×10^{-10} mol/l, 2×10^{-10} mol/l, 3.5×10^{-10} mol/l, 5×10^{-10} mol/l, 7.5×10^{-10} mol/l, 10^{-9} mol/l, 1.5×10^{-9} mol/l, 2×10^{-9} mol/l, 3×10^{-9} mol/l, 5×10^{-9} mol/l, 7.5×10^{-9} mol/l, 10^{-8} mol/l) da bi se odredila ukupna količina vezanog hormona. Nespecifično vezivanje je određeno u prisustvu neobeležnog E2 u 100 puta većim koncentracijama.

Svi eksperimenti su rađeni na 22 °C u medijumu MUM. Vezivanje je započinjalo dodavanjem (3H)estradiola u smešu finalne zapremine 200 μ l. Reakcija je zaustavljena sa 2 ml hladne 0.25 mol/l saharoze 5 mmol/l EDTA. Alikvot od 1 ml iz svake probe je izdvajan i filtriran pod vakuumom kroz nitrocelulozne filtre veličine pora 0.45 μ m. Ispiranjem dva puta sa po 3 ml rastvora kojim je zaustavljena reakcija, odstranjen je nevezani hormon. Iz preostalog 1 ml od svake probe nanošeno je po 20 μ l direktno na filter papir, bez filtracije, radi određivanja ukupnog dodatog aktiviteta. Određivan je i blank filtra i to filtriranjem inkubacione smeše koja nije sadržavala mitohondrije pod istim uslovima kao i smeše sa mitohondrijama. Filtri su sušeni i pakovani u vaje sa po 2 ml scintilacione tečnosti radi merenja radioaktivnosti na β -brojaču (scintilacioni spektrofotometar LKB Wallac, 1219

Rackbeta). Pri obradi dobijenih podataka uzeta je u obzir efikasnost brojača za (³H)estradiol od 60% i blank filtra. Sve probe i totali rađeni su u triplikatu.

9.1. Određivanje kinetičkih karakteristika vezivanja estradiola za izolovane sinaptosomalne mitohondrije

Afinitet i kapacitet specifičnog vezivanja estradiola za izolovane sinaptosomalne mitohondrije određivani su grafički iz Michaelis-Menten-ove krive koja se konstruiše nanošenjem koncentracije hormona specifično vezanog za mitohondrije (nmol/mg) na ordinatu i koncentracije slobodnog hormona (nmol/l) na abscisu koordinatnog sistema. Michaelis-Menten-ova kriva je rektangularna hiperbola opisana jednačinom:

$$B = B_{\max} \times F / (F + K_d)$$

B= koncentracija liganda specifično vezanog za protein

F= koncentracija slobodnog (nevezanog) liganda

B_{max}= ukupna koncentracija vezujućih mesta

K_d= konstanta disocijacije

Kriva je u platou na horizontalnoj asimptoti koja predstavlja B_{max}. Vrednost B_{max} određuje kapacitet vezivanja. Afinitet vezivanja hormona za protein određuje se prema Michaelis-Menten-ovoj konstanti (K_m), koja označava onu koncentraciju slobodnog hormona pri kojoj je polovina od ukupnog broja vezujućih mesta okupirana hormonom, tj. kada je B=B_{max}/2.

Određivanje kinetičkih parametara vezivanja hormona iz Michaelis-Menten-ove krive nije dovoljno precizno, zato smo primenili dva tipa linearizacije.

Scatchard-ov grafik opisuje jednačina:

$$B/F = (B_{\max}/K_d) - (1/K_d) \times B$$

a dobija se nanošenjem vrednosti kvocijenta koncentracije specifično vezanog hormona sa koncentracijom slobodnog hormona na ordinatu i koncentracije specifično vezanog hormona na abscisu. U slučaju postojanja samo jednog tipa vezujućih mesta (kao što je slučaj u našim eksperimentima) i ako se vezivanje odvija po zakonu delovanja masa, ovaj grafik je prava linija čiji je nagib jednak recipročnoj vrednosti konstante disocijacije (1/K_d). B_{max} se čita sa grafika kao vrednost na kojoj linija preseca x-osu.

Odradili smo i linearizaciju po Hill-u, koja je opisana jednačinom:

$$B = (F)^n (B_{\max}) / (F)^n + K_d$$

Hill-ov grafik se dobija nanošenjem vrednosti $\log B/(B_{\max}-B)$ na ordinatu i $\log F$ na abscisu. Nagib dobijene prave ima vrednost „n“ iz Hill-ove jednačine. Kada je $n=1$ (kao u našim eksperimentima) u ispitivanom slučaju je postojao jedan tipa vezujućih mesta za dati hormon i vezivanje se odvijalo po zakonu delovanja masa

10. Western blot analiza

Western blot, uključujući elektroforetsko razdvajanje proteina SDS-PAGE elektroforezom, predstavlja prenos proteina sa poliakrilamidnog gela na polivinil fluorid-PVDF membranu (transfer) i zatim detekciju specifičnih proteina pomoću primarnih i sekundarnih antitela povezanih sa enzimom čija se aktivnost detektuje prisustvom obojenog produkta.

Elektroforetsko razdvajanje proteina izvršeno je na Mini-trans Blot III kadici (Bio-Rad). U bunariće je sipano po 16 μ l pripremljenih uzoraka (40 μ g proteina). Oba poliakrilamidna gela pripremaju se od sledećih rastvora: tris pufer (1.5 mol/l Tris pH 8.8 za razdvajajući gel i 0.5 mol/l Tris pH 6.8, za koncentrujući gel), 30% akrilamid-metilenbisakrilamid, 10% SDS i destilovana voda; neposredno pred upotrebu dodaje se 10% amonijum persulfat (APS) i tetraetilmetilen diamin (TEMED). U eksperimentima su korišćeni 8%-tni gel za razdvajanje i 5%-tni gel za koncentrovanje. Elektroforeza se odvijala u odgovarajućem puferu za elektroforezu koji sadrži Tris, glicin i SDS. Voltaža pri kojoj je rađeno elektroforetsko razdvajanje proteina bila je 120 V, razdvajanje je trajalo ~2 h, na RT.

Nakon završene elektroforeze gelovi su potopljeni u transfer pufer (20% metanol, 0.025 mol/l Tris-baza, 0.192 mol/l glicin, pH 8.3). PVDF membrane odgovarajuće veličine su prvo aktivirane 15 s u 100% metanolu, ispirane vodom i potopljene u transfer pufer. Nakon 10 min formiran je „sendvič“ od 3 papira Whatman 3MM, poliakrilamidnog gela, PVDF membrane i sledeća 3 papira Whatman 3MM (sve natopljeno transfer puferom). Ovako napravljen „sendvič“ se postavi u aparat za mokri transfer (Trans-Blott cell, Bio-Rad) i dodatno potopi u pufer za transfer. Prenos proteina sa gelova na membrane se odvijao pri konstantnom naponu od 20 V i jačini struje ograničenoj na 0.1 A, na 4°C, preko noći.

Po završetku transfera membrane su bojene 1% rastvorom Ponceau S u 5% sirćetnoj kiselini da bi se utvrdila efikasnost transfera. Boja Ponceau S je uklanjana uzastopnim

ispiranjem vodom. PVDF membrane su inkubirane 1-2 h u puferu za blokiranje, 5% BSA u TBST puferu (50 mmol/l Tris pH 7.5, 150 mmol/l NaCl, 0.1% Tween 20), na RT, uz blago mućkanje. Tako tretirana membrana je vertikalno presecana na tri dela da bi svaki deo poslužio za odvojenu detekciju ER α , ER β ili HSP70. Delovi membrane su inkubirani sa primarnim antitelima na ER α , ER β ili HSP70, na 4°C, preko noći. Razblaženja svih primarnih antitela u su bila 1: 1000, u 5% BSA u TBST-u. Po završenoj inkubaciji sa primarnim antitelom, membrane su ispirane 4 puta po 5 min TBST puferom na RT, uz blago mućkanje. Nakon ispiranja, membrane su inkubirane sa sekundarnim anti-zečijim (odnosno anti-mišijim) antitelima sa vezanom HRP. Antitela sa bila razblažena u 5% BSA u TBST puferu 1: 5000 za ER α , odnosno 1: 8000 za ER β i HSP70. Inkubacija je trajala 1.5 h. Membrane su zatim ispirane 4 puta po 5 min u TBST puferu pa još 5 min u TBS puferu.

Trake proteina od interesa obeležene su Luminolom, koji reaguje sa molekulom HRP na sekundarnom antitelu i emituje signal koji može biti prenesen na fotografski film (AGFA). Filmovi su razvijani i fiksirani u mračnoj komori.

IV REZULTATI

Polazeći od definisanih ciljeva, eksperimentalni rad u okviru ove doktorske teze je bio podjeljen na tri dela. U prvom delu urađena je analiza mitohondrijskih preparata. U drugom delu praćeni su efekti estradiola *in vitro* na transport Ca^{2+} u izolovane sinaptosomalne mitohondrije. U trećem delu ispitani su mogući mehanizmi preko kojih estradiol ostvaruje uočene efekte, s posebnim naglaskom na ispitivanju vezivanja estradiola za mitohondrije i uloge mitohondrijskih estradiolskih receptora (mtER).

1. Provera prečišćenosti mitohondrijskih preparat

Za istraživanja u okviru ove doktorske teze korišćene su mitohondrije izolovane iz nervnih završetaka (sinaptozoma) hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla ovarijektomisanih (OVX) ženki pacova prema modifikovanoj metodi Lai i Clark (1970) (Materijal i metode 2.3.). Kao mera prečišćenosti preparata poslužila nam je aktivnost enzima lociranog na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani, F_0F_1 -ATPaze, u prisustvu odabranih inhibitora: oubaina (inhibitor plazma membranske Na^+/K^+ -ATPaze), teofilina (inhibitor nespecifičnih fosfataza), NaN_3 (inhibitor Ca^{2+} -stimulisanih ATPaza) i oligomicina (specifični inhibitor F_0F_1 -ATPaze). Rezultati ovih ispitivanja su prikazani u Tabeli 1.

Tabela 1. Totalna F_0F_1 -ATPazna aktivnost u liziranim sinaptosomalnim mitohondrijama izolovanim iz hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla, u prisustvu inhibitora.

INHIBITOR	INHIBICIJA (%)		
	Hip	NC	BS
oligomicin 100 mg/ mg proteina	84.2	86.4	82.5
NaF/ teofilin 1 mmol/l/ 1 mmol/l	9.0	6.5	8.7
ouabain 0.2 mmol/l	13.1	11.6	10.3
NaN ₃ 100 μmol/l	0	0	0

Totalna ATPazna aktivnost u prisustvu 1.5 mmol/l ATP i bez inhibitora određena je kao 100% i iznosila je, izraženo u μmol Pi/mg proteina/min, 0.29 ± 0.03 za Hip, 0.24 ± 0.02 za NC i 0.21 ± 0.04 za BS. Prikazani rezultati su srednja vrednost dobijena iz tri eksperimenta (tri nezavisne izolacije mitohondrija) rađena u triplikatu.

Na osnovu dobijenih rezultata se moglo zaključiti da je kontaminacija plazma membranama od 10 do 13% i da je prečišćenost mitohondrijskog preparata zadovoljavajuća za dalji rad.

2. Aktivnost F_0F_1 - ATPaze

Nakon urađene kontrole prečišćenosti preparata, ispitivana je aktivnost F_0F_1 -ATPaze u sinaptosomalnim mitohondrijama izolovanim iz celog mozga intaktnih i ovarijektomisanih životinja. Ovim eksperimentima želeli smo proveriti da li aktivnost F_0F_1 -ATPaze zavisi od endogeno prisutnih gonadnih hormona (endogenog E2), odnosno da li zavisi od faze estrusnog ciklusa i ovarijektomije. Na osnovu dobijenih rezultata nameravali smo zaključiti da li istraživanja možemo nastaviti na mitohondrijama izolovanim iz intaktnih životinja ili treba koristiti OVX životinje. Takođe smo hteli proveriti da li postoji razlika u aktivnosti F_0F_1 -ATPaze u pojedinim moždanim regionima. Zato smo enzimsku aktivnost pratili u mitohondrijama izolovanim iz hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla.

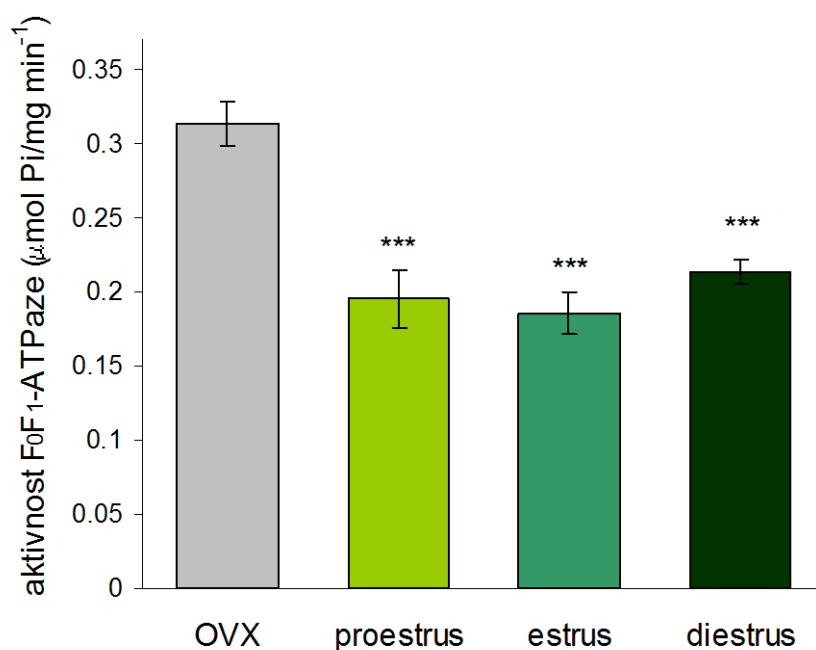
2.1. Aktivnost F_0F_1 -ATPaze u sinaptozomalnim mitohondrijama izolovanim iz celog mozga intaktnih i ovarijektomisanih životinja

Aktivnost F_0F_1 -ATPaze smo merili u sinaptozomalnim mitohondrijama izolovanim iz celog mozga intaktnih i OVX životinja. U slučaju intaktnih ženki uzete su u obzir različite faze estrusnog ciklusa, zbog različitog nivoa endogenog estradiola (Slika 1). Rezultati pokazuju da između sinaptozomalnih mitohondrija izolovanih tokom različitih faza estrusnog ciklusa nema značajne razlike u aktivnosti F_0F_1 -ATPaze, koja je iznosila 0.18 ± 0.03 $\mu\text{mol Pi/mg proteina/min}$ za proestrus, 0.19 ± 0.03 $\mu\text{mol Pi/mg proteina/min}$ za estrus i 0.21 ± 0.02 $\mu\text{mol Pi/mg proteina/min}$ za diestrus. Međutim, u mitohondrijama izolovanim iz OVX jedinki, izmerena je aktivnost od 0.31 ± 0.03 $\mu\text{mol Pi/mg proteina/min}$, što je značajno više ($36 \pm 4\%$) u odnosu na mitohondrije iz intaktnih životinja. Ovaj rezultat je pokazao da aktivnost F_0F_1 -ATPaze zavisi od prisutnosti endogenih gonadnih hormona i da je najveća u mitohondrijama iz ovarijektomisanih životinja.

S obzirom da je naš primarni cilj bio da ispitamo uticaj estradiola na mitohondrijski transpot Ca^{2+} i da su estradiol-vezujuća mesta u mitohondrijama bila nedovoljno definisana, a da su Zheng i Ramirez (1999) našli da se E2 vezuje za oligomicin-senzitivnu (OSCP) subjedinicu F_0F_1 -ATPaze, došli smo do pretpostavke da bi vezivanje za F_0F_1 -ATPazu moglo predstavljati jedan od puteva preko kojih bi E2 ostvarivao efekat na mitohondrijske mehanizme za transport Ca^{2+} . Sve to nas je navelo da se u narednim fazama istraživanja opredelimo za rad na mitohondrijama sa najvećom izmerenom aktivnošću F_0F_1 -ATPaze, tj. na sinaptozomalnim mitohondrijama izolovanim iz ovarijektomisanih jedinki.

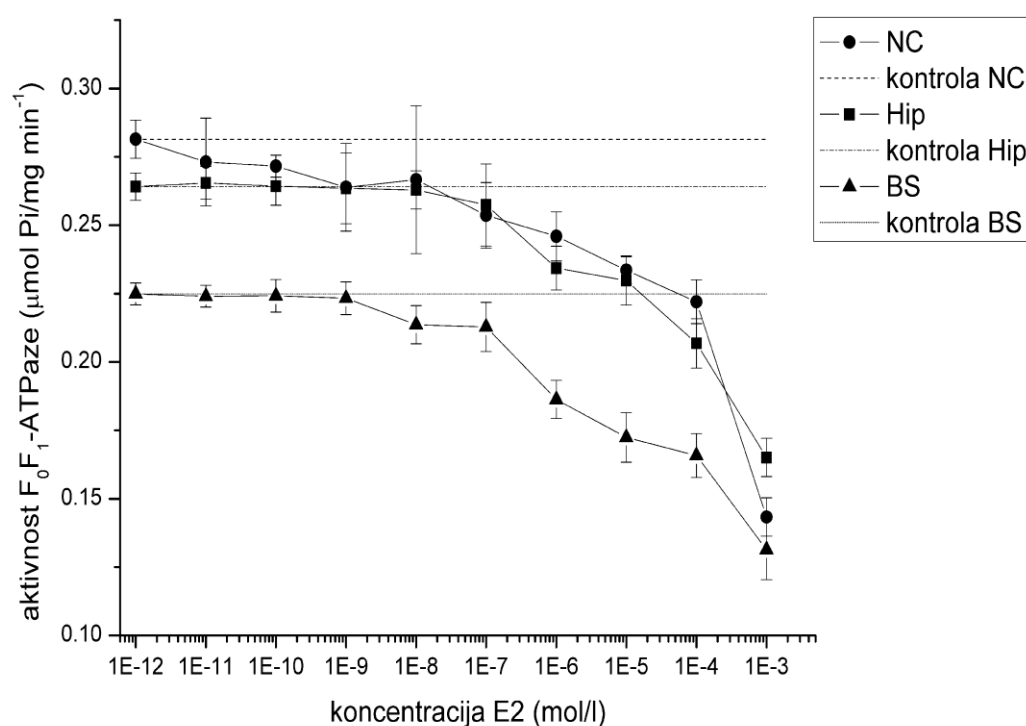
2.2. Aktivnost F_0F_1 -ATPaze u sinaptozomalnim mitohondrijama izolovanim iz hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla ovarijektomisanih životinja

U nameri da se ispita eventualna razlika između specifičnih moždanih regiona merena je aktivnost F_0F_1 -ATPaze u sinaptozomalnim mitohondrijama izolovanim iz Hip, NC i BS i to u kontrolnim uslovima (bez E2) i u prisustvu različitih koncentracija E2 (10^{-12} – 10^{-3} mol/l) (Slika 2). U kontrolnim uslovima izmerene su slične vrednosti: 0.26 ± 0.07 $\mu\text{mol Pi/mg proteina/min}$ za Hip, 0.28 ± 0.07 i 0.22 ± 0.04 $\mu\text{mol Pi/mg proteina/min}$ za NC i BS.



Slika 1. Totalna F_0F_1 -ATPazna aktivnost u sinaptozomalnim mitohondrijama izolovanim iz celog mozga intaktnih ženki žrtvovanih u proestrusnoj, estrusnoj i diestrusnoj fazi ciklusa i ovarijskectomisanih ženki.

Mitohondrije (0.2 mg/ml) su preinkubirane 10 min na 30°C u medijumu sastava: 10 mmol/l Tris-HCl pH 8.0 i 3 mmol/l MgCl_2 , ukupne zapremine 0.5 ml. Enzimska reakcija je pokretana dodavanjem 1.5 mmol/l ATP i trajala je 10 min. Aktivnost enzima je izražena u μmolima oslobođenog fosfata po mg proteina po min. Prikazani rezultati su dobijeni iz tri eksperimenta rađena u triplikatu, \pm SEM. *** Statistički značajna razlika u odnosu na OVX, $p < 0.001$.



Slika 2. Efekat estradiola na aktivnost F₀F₁-ATPaze u sinaptozomalnim mitohondrijama izolovanim iz hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla ovarijektomisanih ženki, u zavisnosti od koncentracije.

Mitohondrije (0.2 mg/ml) su preinkubirane u odsutvu ili prisustvu E2, 10 min na 30°C u medijumu sastava: 10 mmol/l Tris-HCl pH 8.0 i 3 mmol/l MgCl₂, ukupne zapremine 0.5 ml. Enzimska reakcija je pokretana dodavanjem 1.5 mmol/l ATP i trajala je 10 min. Prikazani rezultati su dobijeni iz tri eksperimenta rađena u triplikatu, ± SEM. Na grafikonu su ravnim linijama predstavljene enzimske aktivnosti dobijene u odsustvu E2.

Kada je u pitanju uticaj estradiola, na osnovu rezultata opisanih u poglavlju Rezultati 2.1. koji su pokazali da je aktivnost F_0F_1 -ATPaze veća u OVX (otsustvo gonadnih hormona) nego kod intaktnih jedinki, moglo se očekivati da će estradiol *in vitro* imati inhibitorni efekat na enzimsku aktivnost izmerenu u mitohondrijama iz OVX jedinki. Međutim, naši eksperimenti nisu potvrdili tu pretpostavku. Nađeno je da E2 u koncentracijama od 10^{-7} mol/l i nižim, nema uticaja na aktivnost F_0F_1 -ATPaze u mitohondrijama iz bilo kog ispitivanog regiona. Tako je u prisustvu 10^{-7} mol/l E2 izmerena enzimska aktivnost od $97 \pm 5\%$ za Hip, $92 \pm 3\%$ za NC i $95 \pm 4\%$ za BS, u odnosu na kontrolne vrednosti bez E2. Tek visoke koncentracije E2 ($10^{-6} - 10^{-3}$ mol/l) su značajno inhibirale F_0F_1 -ATPaznu aktivnost.

3. Određivanje koncentracije estradiola u serumu

Polazeći od cilja istraživanja da se ispita efekat estradiola na mitohondrijske mehanizme za transport Ca^{2+} , želeli smo da proverimo da li su koncentracije tog hormona u serumu naših ovarijektomisanih životinja dovoljno niske da ne bi mogle imati uticaja na rezultate eksperimenata. Koncentracija E2 je određivana u serumu OVX životinja žrtvovanih tri sedmice nakon operacije. Enzimskim imunoesejem namenjenim za ljudski ili pacovski serum ili plazmu (EIA Estradiol Test Kit, Bio Check, Inc., Foster City, USA) analizirano je šest uzoraka u duplikatu. Vrednosti izmerenog E2 su bile 0.89-1.4 pg/ml što je odgovaralo doljnoj granici vrednosti zabeleženih u literaturi, od 1-5 pg/ml E2 u serumu OVX životinja. Kada su izmerene vrednosti preračunate u mol/l, dobijene su koncentracije od 3.27×10^{-12} - 5.14×10^{-12} mol/l. Ovim rezultatom je pokazano da je koncentracija estradiola u serumu naših ovarijektomisanih životinja veoma niska i da neće uticati na efekte tog hormona koje smo nameravali da ispitamo.

Na osnovu do sada prikazanih analiza moglo se zaključiti da su naši preparati sinaptosomalnih mitohondrija, izolovani iz određenih moždanih regiona ovarijektomisanih ženki pacova, podesan materijal za ispitivanje efekata estradiola na mitohondrijske mehanizme za transport Ca^{2+} . Istraživanja su nastavljena eksperimentima u kojima se pratio mitohondrijski ulazak i izlazak Ca^{2+} u kontrolnim uslovima i u prisustvu estradiola.

4. Efekat estradiola *in vitro* na ulazak Ca^{2+} u sinaptosomalne mitohondrije različitih regiona mozga pacova

Iako postoje brojni radovi koji se odnose na uticaj estradiola na Ca^{2+} transportne mehanizme locirane u plazma membranama neurona, direktan efekat E2 na transport Ca^{2+} u sinaptosomalnim mitohondrijama različitih regiona mozga pacova gotovo da nije bio predmet do sada objavljenih istraživanja.

S obzirom da su rezultati ranijih istraživanja sprovedenih u našoj laboratoriji pokazali da E2 moduliše citosolnu koncentraciju Ca^{2+} u sinaptosomima celog mozga i pojedinih moždanih regiona, kao i koncentraciju Ca^{2+} u sinaptosomalnim mitohondrijama celog mozga, te da su oba pomenuta efekta u vezi sa specifičnim vezivanjem E2 za sinaptosome, odnosno sinaptosomalne mitohondrije, želeli smo ispitati da li estradiol ostvaruje sličan efekat i na Ca^{2+} transport u sinaptosomalnim mitohondrijama ispitivanih moždanih regiona.

4.1. Ulazak Ca^{2+} u sinaptosomalne mitohondrije izolovane iz hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla u kontrolnim uslovima

Rezultati dobijeni praćenjem ulaska Ca^{2+} u sinaptosomalne mitohondrije Hip, NC i BS u kontrolnim uslovima prikazani su na slici 3. Vrednosti unetog Ca^{2+} kroz rutenijum redosetljive uniportere (RU) je: 4.81 ± 0.23 nmol Ca^{2+} /mg proteina za Hip, 5.25 ± 0.14 nmol Ca^{2+} /mg proteina za NC i 3.07 ± 0.29 nmol Ca^{2+} /mg proteina za BS. Uočeno je da je ulazak Ca^{2+} u mitohondrije BS niži u odnosu na Hip i NC. Naša sledeća namera je bila da ispitamo efekte estradiola na ovaj proces.

4.2. Efekat estradiola na ulazak Ca^{2+} u sinaptosomalne mitohondrije izolovane iz hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla, *in vitro*, u zavisnosti od koncentracije

Pratili smo ulazak Ca^{2+} u sinaptosomalne mitohondrije Hip, NC i BS u prisustvu različitih koncentracija estradiola (10^{-12} - 10^{-5} mol/l) i dobili rezultate prikazane na slici 4. Kao i u slučaju sinaptosomalnih mitohondrija izolovanih iz celog mozga (Horvat i sar., 2000; Horvat i sar., 2001) nismo našli uticaj E2 na ulazak Ca^{2+} u sinaptosomalne mitohondrije ni kod jednog

od ispitivanih regiona. Stimulacija ulaska nađena sa estradiolom u koncentracijama 10^{-6} mol/l i višim nije se mogla smatrati specifičnom.

Pošto nismo detektovali direktan efekat estradiola na ulazak Ca^{2+} u mitohondrije putem rutenijum red-osetljivih uniportera, želeli smo da ispitamo da li estradiol u *in vitro* uslovima može imati indirektan uticaj na unos Ca^{2+} modulišući potencijal mitohondrijske membrane ($\Delta\Psi_m$) i ulazak Ca^{2+} u uslovima narušenog $\Delta\Psi_m$.

4.3. Uticaj estradiola na potencijal mitohondrijske membrane ($\Delta\Psi_m$) i ulazak Ca^{2+} u sinaptosomalne mitohondrije izolovane iz hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla

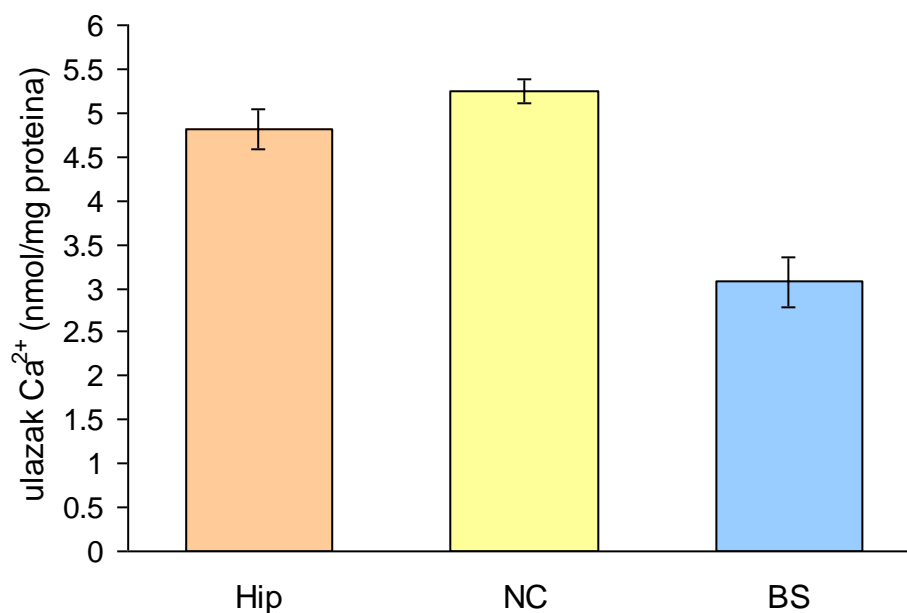
Poznato je da aktivnost rutenijum red-osetljivih kanala za Ca^{2+} ovisi o $\Delta\Psi_m$. U daljem radu pratili smo efekat estradiola na $\Delta\Psi_m$ i na ulazak Ca^{2+} u uslovima narušenog $\Delta\Psi_m$. Na taj način želeli smo ispitati da li E2 delujući na $\Delta\Psi_m$, može istovremeno ostvarivati uticaj i na aktivnost mehanizama ulaska Ca^{2+} u mitohondrije.

Ispitivani su uticaji FCCP, E2 i E2+FCCP na mitohondrije prethodno napunjene fluorescentnom bojom rodamin 123 (RH 123). Rezultati tih ispitivanja prikazani su na slici 5. FCCP je inhibitor oksidativne fosforilacije i ujedno agens koji narušava $\Delta\Psi_m$. Za potrebe naših eksperimentata FCCP je dodavan u koncentraciji 10^{-6} mol/l za koju smo prethodno našli u literaturi da deluje na $\Delta\Psi_m$ (Schellenberg i sar., 1985; Babcock and Hille, 1998). Na način kako je opisano u Matrijal i metode 9., mitohondrije su inkubirane u rastvoru RH 123 (5×10^{-6} mol/l) i punile su se bojom, što je imalo za posledicu smanjivanje fluorescence rastvora. Kada je u inkubacionu smešu dodan FCCP došlo je do narušavanja $\Delta\Psi_m$ i izlaska RH 123 iz mitohondrija, a time i do ponovnog porasta fluorescence rastvora. Upravo te promene fluorescence su nam poslužile kao indirektan pokazatelj promena $\Delta\Psi_m$ u našim eksperimentima.

Uočili smo da je FCCP doveo do porasta fluorescence rastvora u slučaju mitohondrija izolovanih iz sva tri moždana regiona, porast je bio $40 \pm 8\%$ za Hip, $25 \pm 5\%$ za NC i $17 \pm 5\%$ za BS, u odnosu na fluorescencu rastvora u kome su bile samo mitohondrije bez FCCP. Taj rezultat je ukazivao na očekivani pad $\Delta\Psi_m$ u prisustvu FCCP. Kada su mitohondrije prethodno napunjene bojom tretirane sa E2 (5×10^{-10} mol/l), nismo registrovali promene u odnosu na fluorescencu rastvora pre tretmana, što je ukazivalo da E2 sam po sebi nije izazivao promene

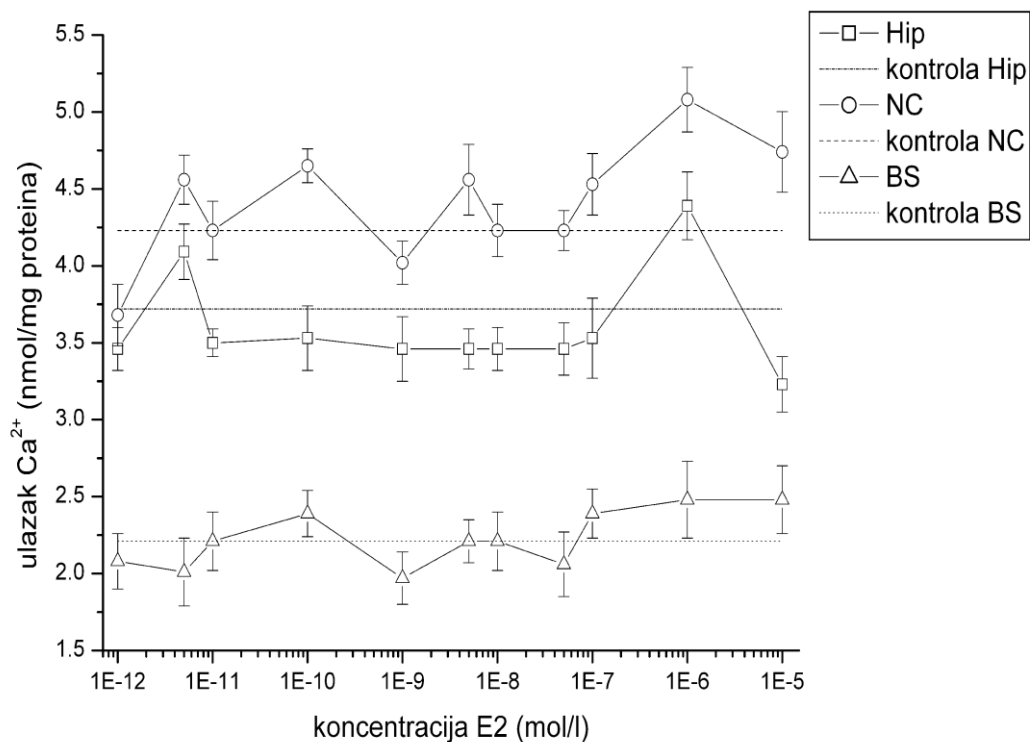
$\Delta\Psi_m$. Međutim, pretretman sa E2 je smanjio izlazak boje iz mitohondrija, a time i porast florescence rastvora izazvan delovanjem FCCP. U prisustvu E2+FCCP fluorescencija rastvora je porasla $28 \pm 7\%$ za Hip, $13 \pm 4\%$ za NC i $8 \pm 5\%$ za BS, u odnosu na fluorescenciju kada su se u rastvoru nalazile samo mitohondrije bez FCCP. Izmereni porast je manji u odnosu na onaj dobijen kada su mitohondrije bile izložene samo delovanju FCCP, a da prethodno nisu bile tretirane sa estradiolom. Na osnovu ovog rezultata moglo se zaključiti da je pretretman sa estradiolom na neki način doprineo očuvanju potencijala mitohondrijske membrane od štetnog uticaja FCCP u slučaju mitohondrija izolovanih iz sva tri regiona.

Da bismo ispitali da li estradiol *in vitro*, delujući preko potencijala mitohondrijske membrane, istovremeno ostvaruje efekat i na ulazak Ca^{2+} u mitohondrije, pratili smo unos Ca^{2+} u prisustvu FCCP, E2 i E2+FCCP, Slika 6. Koristili smo FCCP u istoj koncentraciji (10^{-6} mol/l) sa kojom smo prethodno našli efekat na $\Delta\Psi_m$. Uočeno je da FCCP inhibira ulazak Ca^{2+} u mitohondrije sva tri regiona. Inhibicija je bila $91 \pm 3\%$ za Hip, $88 \pm 2\%$ za NC i $95 \pm 5\%$ za BS u odnosu na ulazak izmeren u kontrolnim uslovima. Kao i u ranije prikazanim eksperimentima, poglavlje Rezultati 4.2., nismo našli efekat E2 na mehanizme ulaska Ca^{2+} , u fiziološkim uslovima. Međutim, u slučaju inkubacije mitohondrija sa E2 pre dodavanja FCCP, nađena je inhibicija ulaska od $79 \pm 5\%$ za Hip, $72 \pm 4\%$ za NC i $82 \pm 7\%$ za BS u odnosu na ulazak izmeren u kontrolnim uslovima. Uočili smo da je pretretman sa estradiolom doprineo smanjenju inhibitornog efekta FCCP, a time i porastu ulaska Ca^{2+} u mitohondrije (faktor porasta je 2.24 za Hip, 2.33 za NC i 3.09 za BS). Na osnovu ovih rezultata je zaključeno da estradiol, u uslovima narušenog potencijala mitohondrijske membrane, ostvaruje efekat na ulazak Ca^{2+} u izolovane sinaptosomalne mitohondrije i da je taj efekat stimulatoran u sva tri ispitivana regiona.



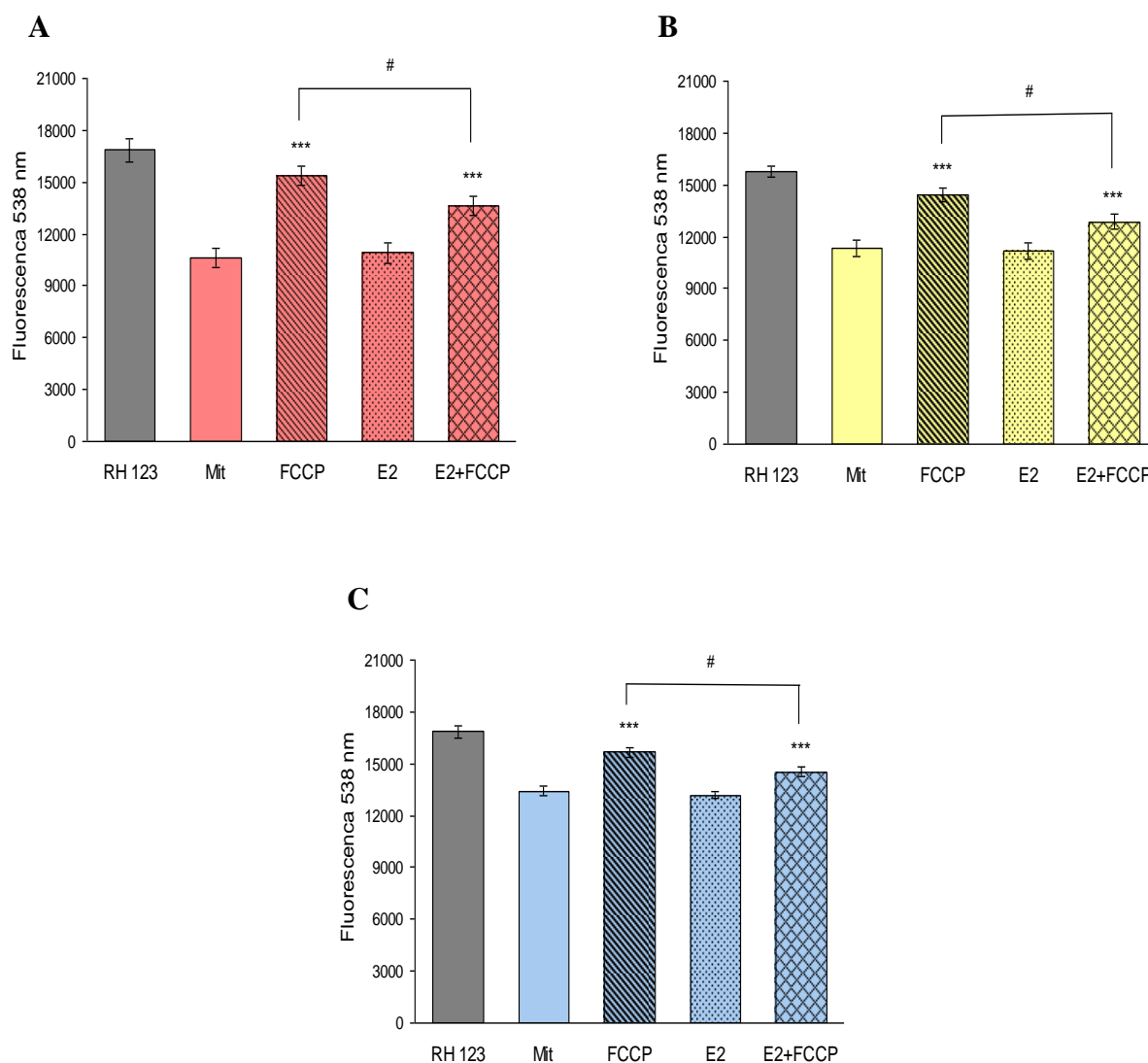
Slika 3. Ulazak Ca²⁺ u sinaptosomalne mitohondrije hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla u kontrolnim uslovima.

Mitohondrije (0.2 mg/ml) su preinkubirane u MUM 10 min na 22°C. Dodano je 200 µmol/l CaCl₂ (0.6-0.7 µCi ⁴⁵CaCl₂) i inkubacija je nastavljena narednih 5 minuta. Sadržaj Ca²⁺ u mitohondrijama je određivan kako je opisano u Matrijal i metode 6.1.1. Rezultatima su prikazane srednje vrednosti ± SEM pet eksperimenata rađenih u triplikatu.



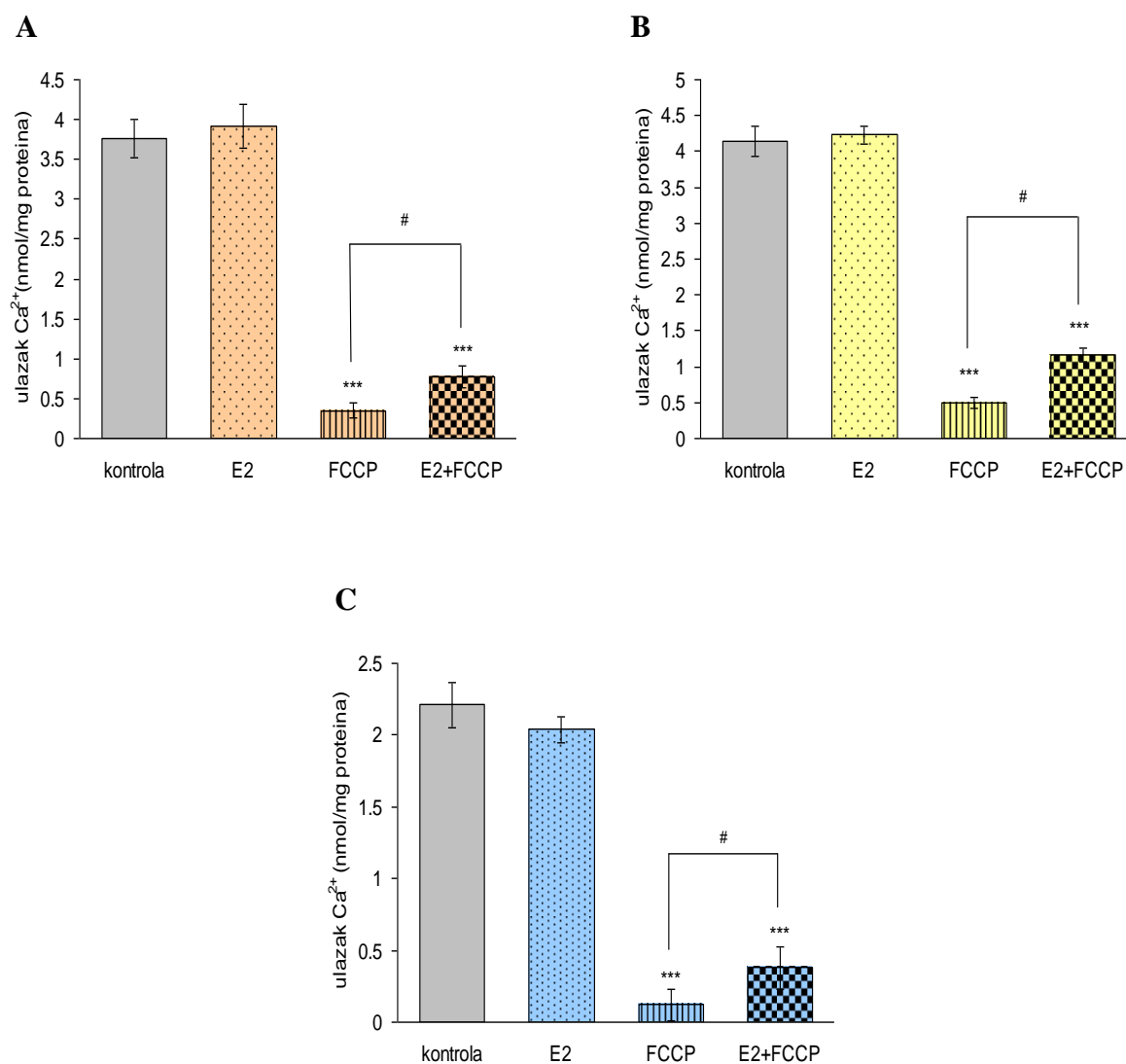
Slika 4. Efekat estradiola na ulazak Ca^{2+} u sinaptozomalne mitohondrije izolovane iz hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla, u zavisnosti od koncentracije.

Mitohondrije (0.2 mg/ml) su preinkubirane u MUM u prisustvu različitih koncentracija E2 (10^{-12} - 10^{-5} mol/l), 10 min na 22°C . Dodano je $200 \mu\text{mol/l}$ CaCl_2 (0.6 - $0.7 \mu\text{Ci}$ $^{45}\text{CaCl}_2$) i inkubacija je nastavljena narednih 5 minuta. Sadržaj Ca^{2+} u mitohondrijama je određivan kako je opisano u Matrijal i metode 6.1.1. Rezultatima su prikazane srednje vrednosti \pm SEM pet eksperimenata rađenih u triplikatu.



Slika 5. Uticaj estradiola i FCCP na potencijal mitohondrijske membrane ($\Delta\Psi_m$) u hipokampusu (A), kaudalnom jedru (B) i moždanom stablu (C).

Merena je fluorescencija rastvora RH 123 (5×10^{-6} mol/l), zatim su u rastvor dodane sinaptosomalne mitohondrije (0.3 mg/ml). Nakon 5 minuta inkubacije ponovljeno je merenje fluorescence. Nakon dodavanja E2, inkubacija je produžena narednih 10 min, a onda je opet određivana fluorescencija. Potom je u inkubacionu smešu dodan FCCP (10^{-6} mol/l) i nakon 3 min ponovo izmerena fluorescencija, Materijal i metode 7. Rezultatima su prikazane srednje vrednosti \pm SEM pet eksperimenata rađenih u triplikatu. *** Statistički značajna razlika u odnosu na fluorescenciju rastvora RH 123 kada se u njemu nalaze samo mitohondrije (stubac Mit na grafikonu), $p < 0.001$. # Statistički značajna razlika između tretmana FCCP i E2+FCCP, $p < 0.05$.



Slika 6. Ulazak Ca²⁺ u sinaptosomalne mitohondrije hipokampusa (A), kaudalnog jedra (B) i moždanog stabla (C) u prisustvu FCCP i estradiola.

Mitohondrije (0.2 mg/ml) su preinkubirane u MUM bez ili sa 5×10^{-10} mol/l E2, 10 min na 22°C. Dodan je FCCP (10^{-6} mol/l) i inkubacija je nastavljena naredna 3 minuta. Zatim su mitohondrije unosile Ca²⁺ tokom 5 min inkubacije sa 200 μ mol/l CaCl₂ (0.6-0.7 μ Ci ⁴⁵CaCl₂). Sadržaj Ca²⁺ u mitohondrijama je određivan kako je opisano u Materijal i metode 6.1.1. Rezultatima su prikazane srednje vrednosti \pm SEM tri eksperimenta rađena u triplikatu.

*** Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, $p < 0.001$. # Statistički značajna razlika između tretmana FCCP i E2+FCCP, $p < 0.05$

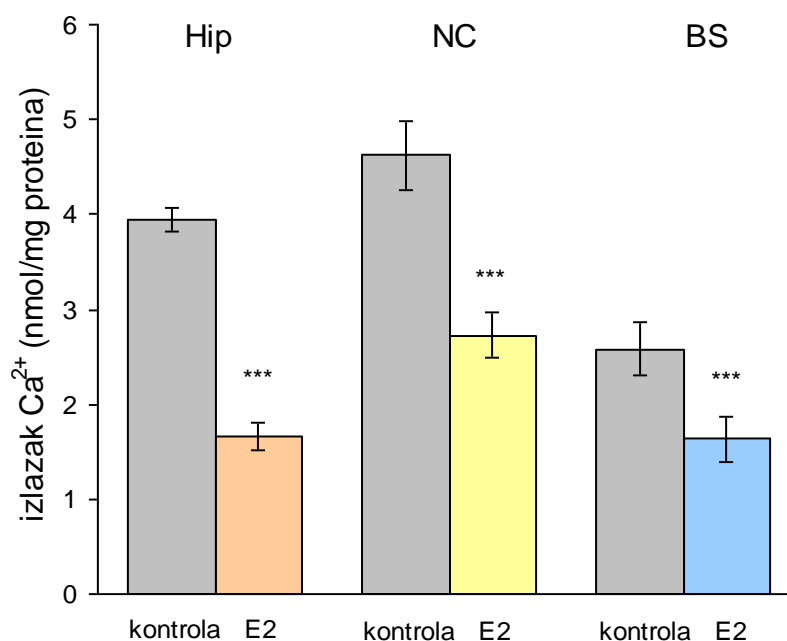
5. Efekat estradiola *in vitro* na Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ iz mitohondrija različitih regiona mozga pacova

5.1. Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ iz sinaptosomalnih mitohondrija u kontrolnim uslovima i u prisustvu estradiola

Pratili smo Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ koji se odigrava posredstvom Na⁺/Ca²⁺-izmenjivača (mtNCX), iz sinaptosomalnih mitohondrija Hip, NC i BS u kontrolnim uslovima i u prisustvu 5×10^{-10} mol/l estradiola i dobili rezultate prikazane na slici 7. U ovim eksperimentima vrednosti izlaska Ca²⁺ u kontrolnim uslovima su bile: za Hip 3.95 ± 0.18 nmol Ca²⁺/mg proteina, za NC 4.62 ± 0.37 nmol Ca²⁺/mg proteina i za BS 2.58 ± 0.28 nmol Ca²⁺/mg proteina. Može se uočiti da je najveći izlazak Ca²⁺ detektovan u NC, a najmanji u BS. Kada su mitohondrije pre pokretanja izlaska kalcijuma tretirane sa E2 (5×10^{-10} mol/l) uočili smo značajnu inhibiciju. Estradiol je najjače inhibirao izlazak Ca²⁺ iz mitohondrija Hip za $58 \pm 3\%$, dok je za mitohondrije NC i BS nađena inhibicija od $41 \pm 5\%$, odnosno $37 \pm 11\%$ u odnosu na kontrolnu vrednost (bez E2).

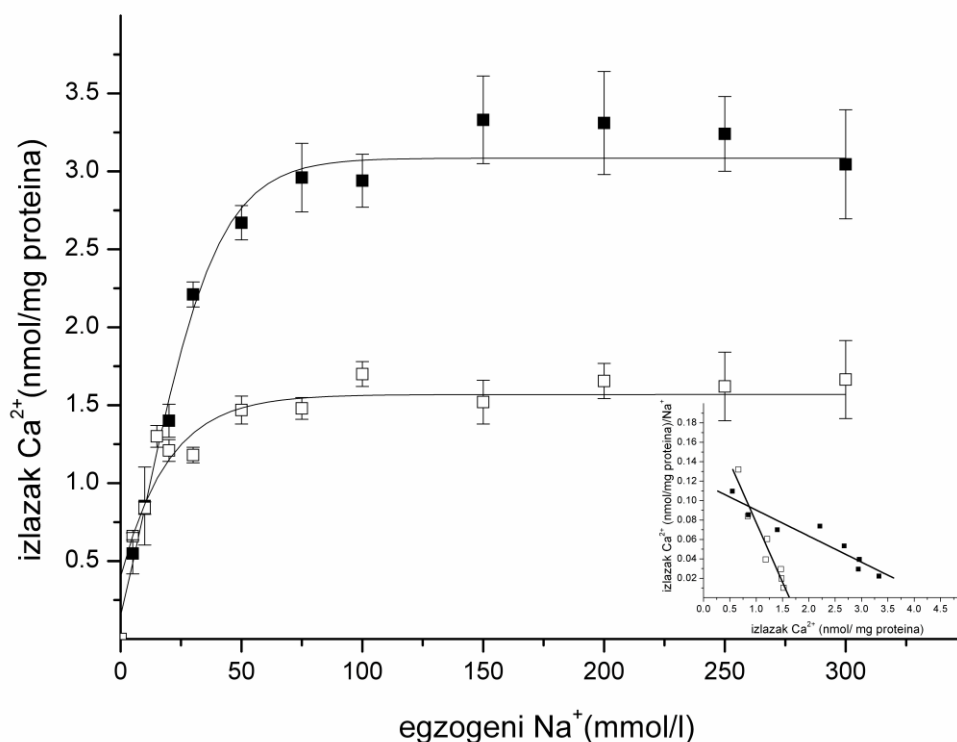
5.2. Uticaj različitih koncentracija egzogenog Na⁺ na Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ iz sinaptosomalnih mitohondrija

U nastavku istraživanja ispitivali smo uticaj estradiola *in vitro* na Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ iz sinaptosomalnih mitohondrija u prisustvu različitih koncentracija egzogenog Na⁺ (0-300 mmol/l). Dobijeni rezultati su prikazani na slikama 8a-c. U mitohondrijama Hip E2 povećava afinitet mtNCX za Na⁺ što je vidljivo kroz snižavanje K_m za $73 \pm 5\%$ u odnosu na kontrolu bez E2 (K_m u kontrolnim uslovima je 32.51 ± 3.7 mmol/l Na⁺, K_m u prisustvu E2 8.96 ± 1 mmol/l Na⁺). Istovremeno E2 snižava maksimalnu brzinu transporta Ca²⁺ za $58 \pm 4\%$ (u kontrolnim uslovima V_{max} je bila 3.95 ± 0.12 , a u prisustvu E2 V_{max} je bila 1.67 ± 0.14 nmol Ca²⁺/mg proteina). Paralelan pad K_m i V_{max} ukazuje na postojanje akompetitivnog tipa inhibicije. Ista tendencija pada vrednosti K_m i V_{max} nađena je i za druga dva regiona. U slučaju mitohondrija NC tretman sa E2 je snizio vrednost K_m sa 57.37 ± 3.9 mmol/l Na⁺ na 30.55 ± 2.8 mmol/l Na⁺.



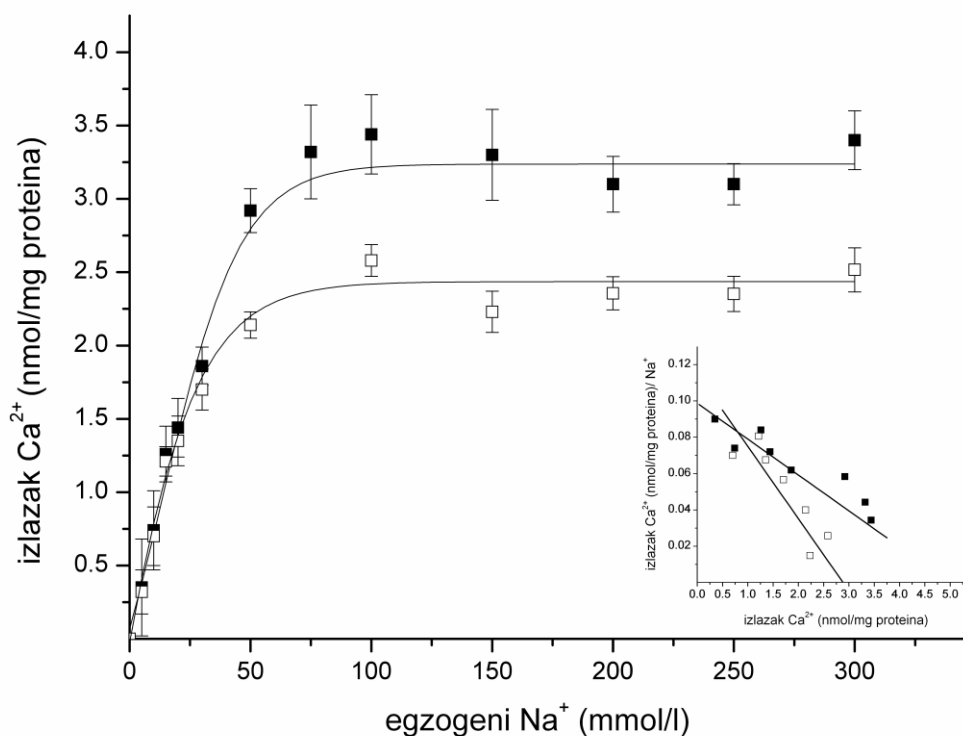
Slika 7. Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ iz sinaptozomalnih mitohondrija hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla u kontrolnim uslovima i u prisustvu estradiola.

Mitohondrije (0.2 mg/ml) su preinkubirane u MUM, 10 min na 22°C, a zatim su unosile Ca²⁺ tokom 5 min inkubacije sa 200 μmol/l CaCl₂ (0.6-0.7 μCi ⁴⁵CaCl₂). Ulazak Ca²⁺ je zaustavljan dodavanjem 0.01 mol/l rutenijum red. Nakon 2 min Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ je pokretan dodavanjem 100 mmol/l NaCl i 0.2 mmol/l EDTA i trajao je 5 min. Kada je ispitivan uticaj E2 dodavan je 5 x 10⁻¹⁰ mol/l E2 pre dodavanja NaCl/EDTA. Uneti Ca²⁺ i količina oslobođenog Ca²⁺ su određivani kako je opisano u Materijal i metode 6.2.1. Rezultatima su prikazane srednje vrednosti ± SEM tri eksperimenta rađena u triplikatu. *** Statistički značajna razlika u odnosu na pripadajuću kontrolu, p < 0.001.



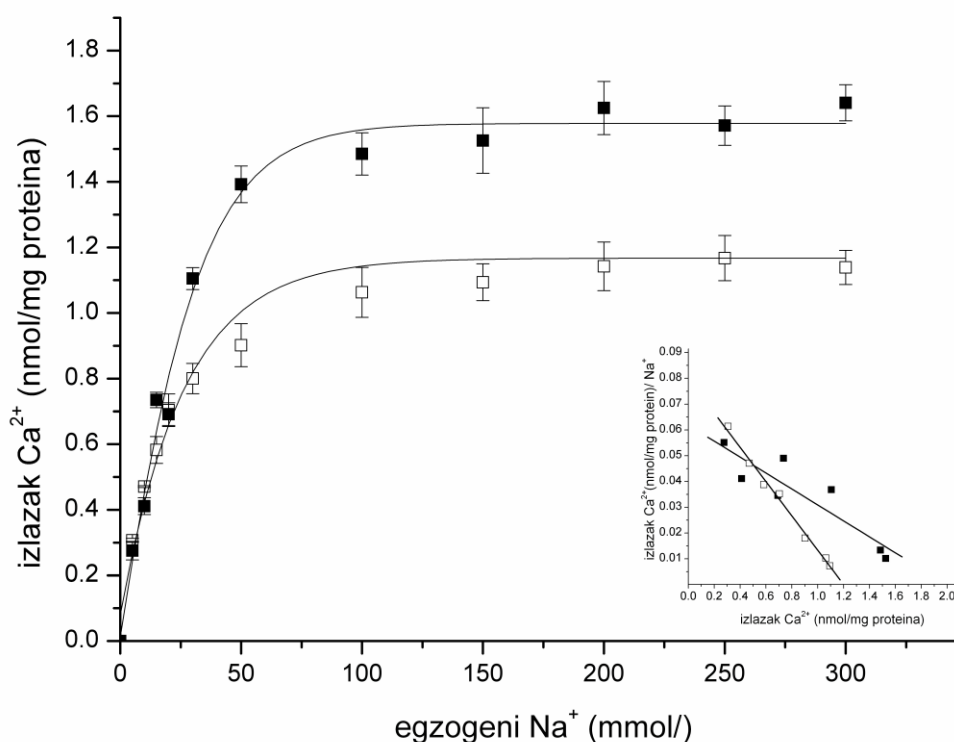
Slika 8a. Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ iz sinaptozomalnih mitohondrija hipokampusa u zavisnosti od koncentracije egzogenog Na⁺, u kontrolnim uslovima i u prisustvu estradiola.

Mitohondrije (0.2 mg/ml) su preinkubirane u MUM, 10 min na 22°C, a zatim su unosile Ca²⁺ tokom 5 min inkubacije sa 200 μmol/l CaCl₂ (0.6-0.7 μCi ⁴⁵CaCl₂). Ulazak Ca²⁺ je zaustavljan dodavanjem 0.01 mol/l rutenijum red. Nakon 2 min Na⁺-zavisni izlazak je pokretan dodavanjem različitih koncentracija NaCl (0-300 mmol/l) i 0.2 mmol/l EDTA i trajao je 5 min. Kada je ispitivan uticaj E2 dodavan je 5 x 10⁻¹⁰ mol/l E2 pre ododavanja NaCl/EDTA. Uneti Ca²⁺ i količina oslobođenog Ca²⁺ su određivani kako je opisano u Materijal i metode 6.2.1. Rezultatima su prikazane srednje vrednosti ± SEM pet eksperimenata rađenih u triplikatu. (■) kontrolni uslovi, (□) prisustvo E2. Umetak predstavlja Scatchard-ov prikaz dobijenih rezultata.



Slika 8b. Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ iz sinaptozomalnih mitohondrija kaudalnog jedra u zavisnosti od koncentracije egzogenog Na⁺, u kontrolnim uslovima i u prisustvu estradiola.

Mitohondrije (0.2 mg/ml) su preinkubirane u MUM, 10 min na 22°C, a zatim su unosile Ca²⁺ tokom 5 min inkubacije sa 200 μmol/l CaCl₂ (0.6-0.7 μCi ⁴⁵CaCl₂). Ulazak Ca²⁺ je zaustavljan dodavanjem 0.01 mol/l rutenijum red. Nakon 2 min Na⁺-zavisni izlazak je pokretan dodavanjem različitih koncentracija NaCl (0-300 mmol/l) i 0.2 mmol/l EDTA i trajao je 5 min. Kada je ispitivan uticaj E2 dodavan je 5 x 10⁻¹⁰ mol/l E2 pre ododavanja NaCl/EDTA. Uneti Ca²⁺ i količina oslobođenog Ca²⁺ su određivani kako je opisano u Materijal i metode 6.2.1. Rezultatima su prikazane srednje vrednosti ± SEM pet eksperimenata rađenih u triplikatu. (■) kontrolni uslovi, (□) prisustvo E2. Umetak predstavlja Scatchard-ov prikaz dobijenih rezultata.



Slika 8c. Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ iz sinaptosomalnih mitohondrija moždanog stabla u zavisnosti od koncentracije egzogenog Na⁺, u kontrolnim uslovima i u prisustvu estradiola.

Mitohondrije (0.2 mg/ml) su preinkubirane u MUM, 10 min na 22°C, a zatim su unosile Ca²⁺ tokom 5 min inkubacije sa 200 μmol/l CaCl₂ (0.6-0.7 μCi ⁴⁵CaCl₂). Ulazak Ca²⁺ je zaustavljan dodavanjem 0.01 mol/l rutenijum red. Nakon 2 min Na⁺-zavisni izlazak je pokretan dodavanjem različitih koncentracija NaCl (0-300 mmol/l) i 0.2 mmol/l EDTA i trajao je 5 min. Kada je ispitivan uticaj E2 dodavan je 5 x 10⁻¹⁰ mol/l E2 pre ododavanja NaCl/EDTA. Uneti Ca²⁺ i količina oslobođenog Ca²⁺ su određivani kako je opisano u Materijal i metode 6.2.1. Rezultatima su prikazane srednje vrednosti ± SEM pet eksperimenata rađenih u triplikatu. (■) kontrolni uslovi, (□) prisustvo E2. Umetak predstavlja Scatchard-ov prikaz dobijenih rezultata.

što je pad od $47 \pm 8\%$ u odnosu na kontrolu. Istovremeno, V_{\max} je snižena za $41 \pm 10\%$ u odnosu na kontrolnu vrednost 5.52 ± 0.57 nmol Ca^{2+} /mg proteina, te je u prisustvu E2 V_{\max} bila 3.25 ± 0.24 nmol Ca^{2+} /mg proteina. Za BS našli smo snižavanje K_m za $53 \pm 10\%$, kontrola $K_m = 32.32 \pm 0.61$ mmol/l Na^+ , sa E2 $K_m = 15.03 \pm 0.6$ mmol/l Na^+ ; i pad V_{\max} za $39 \pm 13\%$, kontrola $V_{\max} = 2.02 \pm 0.19$ nmol Ca^{2+} /mg proteina, sa E2 $V_{\max} = 1.23 \pm 0.17$ nmol Ca^{2+} /mg proteina.

Imajući u vidu da je fiziološka koncentracija Na^+ izmerena u nervnim ćelijama u fazi mirovanja 15 mmol/l (Sherwood, 2008), moramo pomenuti da je E2-inhibicija Na^+ -zavisnog izlaska Ca^{2+} iz sinaptosomalnih mitohondrija sva tri regiona, opisana u ovom poglavlju, uočena samo pri visokim koncentracijama Na^+ (≥ 100 mmol/l), koje su moguće isključivo u uslovima *in vitro*.

Istraživanja smo nastavili ispitivanjem mogućih mehanizama preko kojih estradiol ostvaruje efekat na Na^+ -zavisni izlazak Ca^{2+} iz sinaptosomalnih mitohondrija opisane u ovom radu.

6. Specifično vezivanje estradiola za sinaptosomalne mitohondrije različitih regiona mozga pacova

Na osnovu ranije dobijenih rezultata na sinaptosomima i sinaptosomalnim mitohondrijama celog mozga gde je uočeno specifično vezivanje estradiola, pretpostavili smo da bi vezivanje za specifična mesta na mitohondrijama moglo biti jedan od mehanizama delovanja tog hormona. Zato smo želeli da ispitamo da li postoji specifično vezivanje estradiola za sinaptosomalne mitohondrije izolovane iz hipokampusu, kaudalnog jedra i moždanog stabla i odrediti kinetičke parametre tog vezivanja.

6.1. Optimizacija uslova za ispitivanje specifičnog vezivanja estradiola

U skladu sa primarnim ciljem ovog rada, da se ispita uticaj estradiola na transport Ca^{2+} , kao i mogući mehanizmi delovanja, vezivanje estradiola je praćeno u uslovima koji pogoduju mehanizmima transporta (sastav medijuma, pH, temperatura). Vezivanje je ispitivano u zavisnosti od koncentracije mitohondrijskih proteina, dužine inkubacije mitohondrija sa E2 i koncentracije E2.

Na slici 9. su prikazani rezultati specifičnog vezivanja E2 za sinaptozomalne mitohondrije izolovane iz Hip, NC i BS u zavisnosti od koncentracije mitohondrijskih proteina. Uočili smo da je u prisustvu 5×10^{-10} mol/l E2, specifično vezivanje najveće u prisustvu 30 μ g i više mitohondrijskih proteina u Hip, da raste sa povećanjem količine proteina u NC i da je najveće u prisustvu 20 μ g mitohondrijskih proteina u BS.

Na slici 10. su prikazani rezultati vezivanja E2 za sinaptozomalne mitohondrije u zavisnosti od dužine inkubacije. Zapaženo je da se E2 vrlo brzo vezuje za sinaptozomalne mitohondrije. Već nakon prvog minuta vrednost vezanog hormona za mitohondrije Hip je približno jednaka polovini maksimalnog vezivanja koje je izmereno nakon inkubacije od 10-15 minuta. Prilikom produžene inkubacije uočavamo pad vrednosti vezanog hormona koja ostaje približno jednaka sve do 60-tog minuta. Nakon prvog minuta za mitohondrije NC se vezalo 42%, a posle drugog minuta već 74% od maksimalno vezanog hormona izmerenog nakon 10 minuta inkubacije. Estradiol vezan u prvom minutu inkubacije za mitohondrije iz BS prevazilazi polovinu maksimalnog vezivanja izmerenog nakon 10 minuta. U slučaju sinaptozomalnih mitohondrija iz NC i BS vezivanje u 10-om minutu ulazi u plato i ostaje približno jednako i pri produžavanju inkubacije do 60-tog minuta.

Iako su ispitivanja optimalnih uslova vezivanja estradiola za mitohondrije pokazala da je specifično vezivanje najveće pri koncentracijama mitohondrijskih proteina od 150-250 μ g/ml za Hip i NC, a za BS od 100 μ g/ml, u daljim eksperimentima koristili smo koncentraciju proteina koja je bila prisutna pri praćenju transporta Ca^{2+} , odnosno 200 μ g/ml, a dužina trajanja inkubacije sa hormonom je bila 10 minuta. Ti eksperimenti su rađeni sa ciljem da se odrede kinetički parametri specifičnog vezivanja estradiola za mitohondrije.

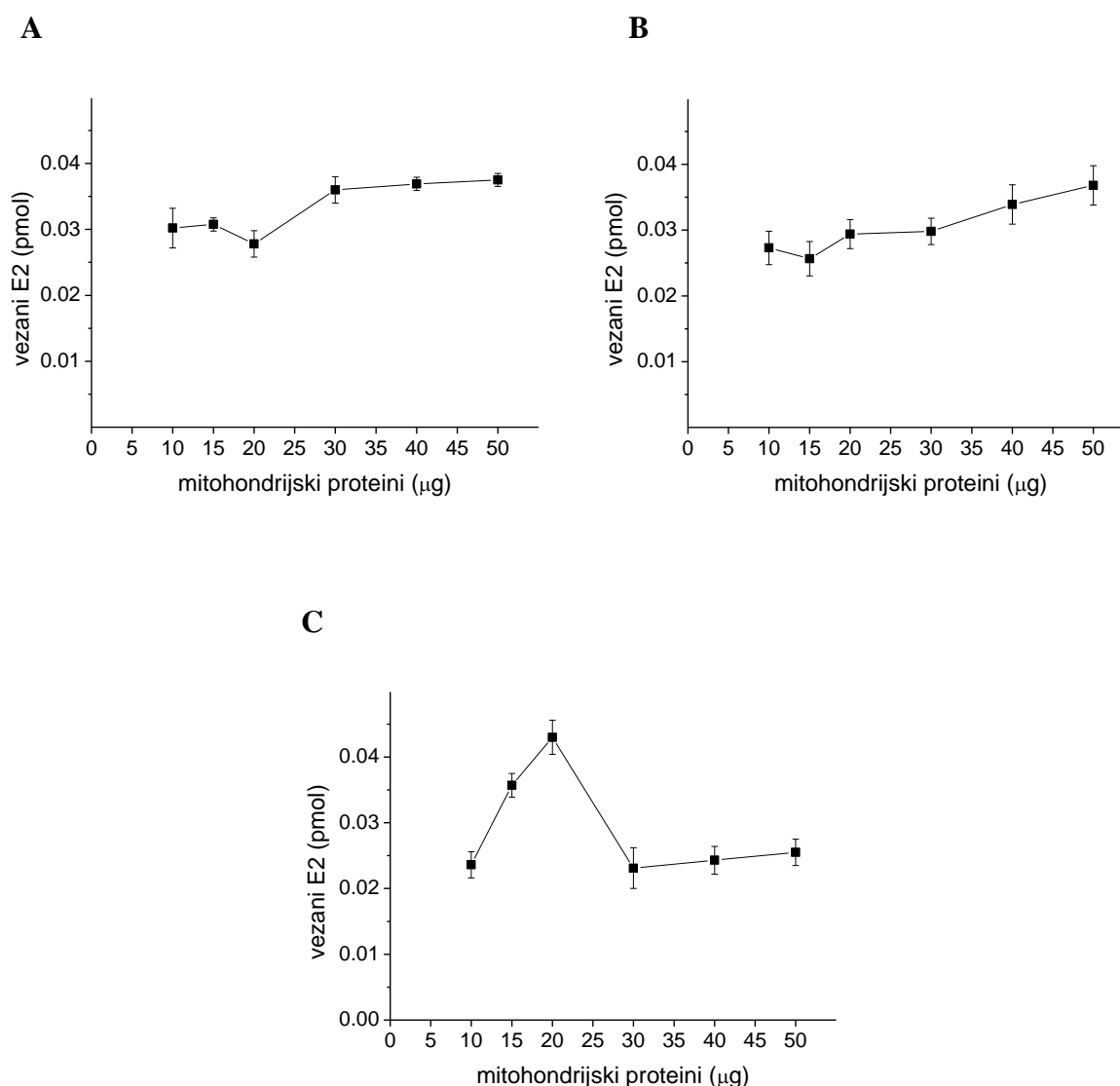
6.2. Karakteristike specifičnog vezivanja estradiola za sinaptozomalne mitohondrije hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla

Razultati dobijeni ispitivanjem uticaja koncentracije estradiola na njegovo vezivanje za mitohondrije predstavljeni su u obliku Michaelis-Menten-ovih grafika koji za sva tri ispitivana regiona imaju oblik hiperbole, Slike 11a-c. U slučaju sinaptozomalnih mitohondrija iz Hip kriva ulazi u plato pri koncentraciji slobodnog E2 od 2 nmol/l. Na osnovu Scatchard-ovog grafika određeno je maksimalno vezivanje $B_{max}=37.6 \pm 2.6$ fmol/mg proteina i koncentracija

slobodnog liganda potrebna za postizanje polovine maksimalnog vezivanja $K_m=0.69 \pm 0.14$ nmol/l. Pri vezivanju E2 za sinaptosomalne mitohondrije iz NC kriva ulazi u plato u prisustvu koncentracije E2 od 2.5 nmol/l, a određeni su $B_{max}=44.9 \pm 5.2$ fmol/mg i $K_m=0.56 \pm 0.11$ nmol/l, dok pri vezivanju E2 za sinaptosomalne mitohondrije iz BS kriva ulazi u plato u prisustvu koncentracije E2 od 2.5 nmol/l, dok su $B_{max}=28.5 \pm 4.7$ fmol/mg i $K_m=0.94 \pm 0.17$ nmol/l. Linearan Scatchard-ov grafik i Hill-ov koeficijent $n=1.01$ za Hip, $n=1.13$ za NC i $n=0.94$ za BS idu u prilog postojanju jedne (homogene) klase vezujućih mesta.

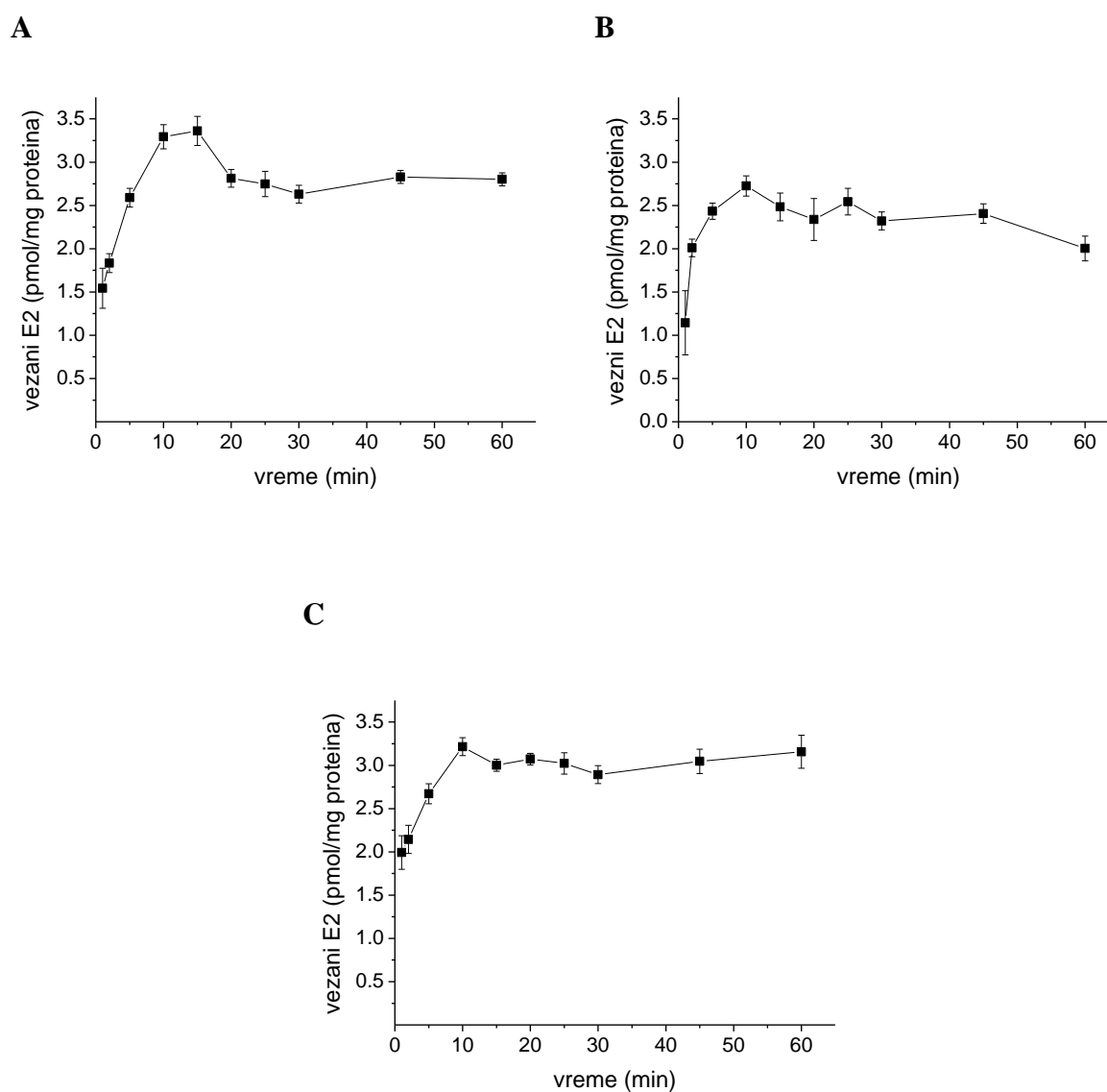
Eksperimenti kojima je praćeno vezivanje su pokazali da se estradiol *in vitro* vezuje za sinaptosomalne mitohondrije izolovane iz hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla i da je to vezivanje specifično. Štaviše, nađena je korelacija između koncentracija pri kojima se estradiol specifično vezuje za mitohondrije i koncentracije (5×10^{-10} mol/l) u kojoj on ostvaruje efekat na Na^+ -zavisni izlazak Ca^{2+} .

Nastavili smo sa eksperimentima kojima smo želeli ispitati mehanizme delovanja estradiola na izlazak Ca^{2+} iz mitohondrija.



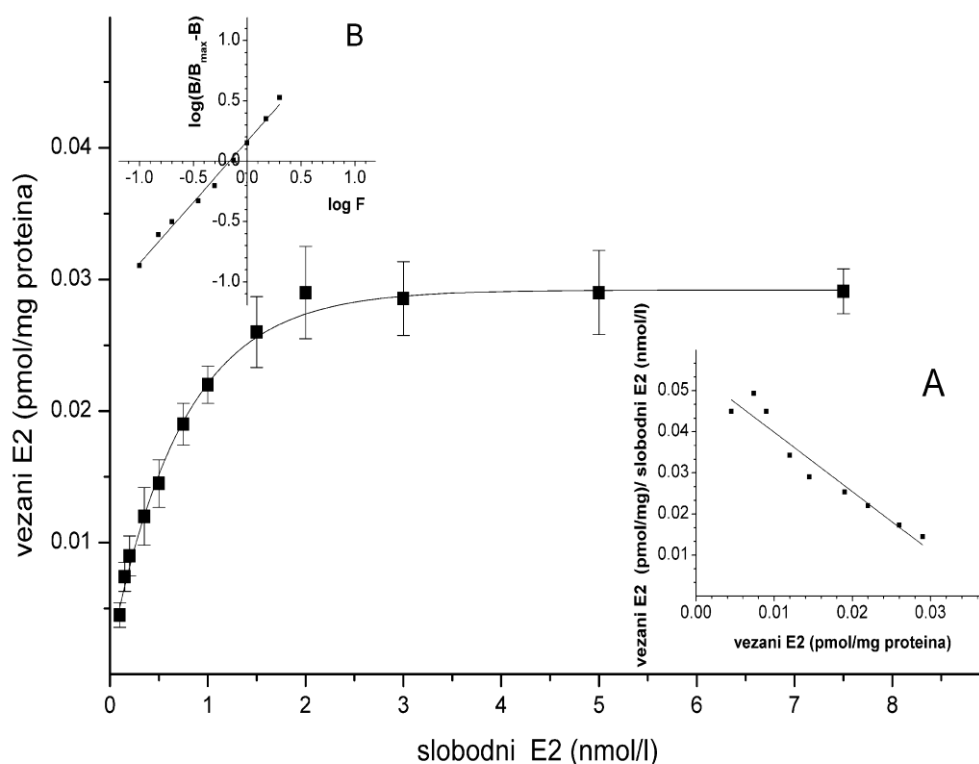
Slika 9. Specifično vezivanje estradiola za sinaptosomalne mitohondrije hipokampusa (A), kaudalnog jedra (B) i moždanog stabla (C), u zavisnosti od koncentracije mitohondrijskih proteina.

Različite koncentracije mitohondrija (0.05-0.25 mg/ml) su preinkubirane u MUM, 10 min na 22°C. Nakon preinkubacije dodan je E2 u koncentraciji 5×10^{-10} mol/l, u smešu finalne zapremine 0.2 ml i inkubacija je produžena narednih 10 min. Količina vezanog E2 izražena u pmol je izračunata na osnovu radioaktivnosti, Materijal i metode 6. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM iz tri eksperimenta rađena u triplicatu.



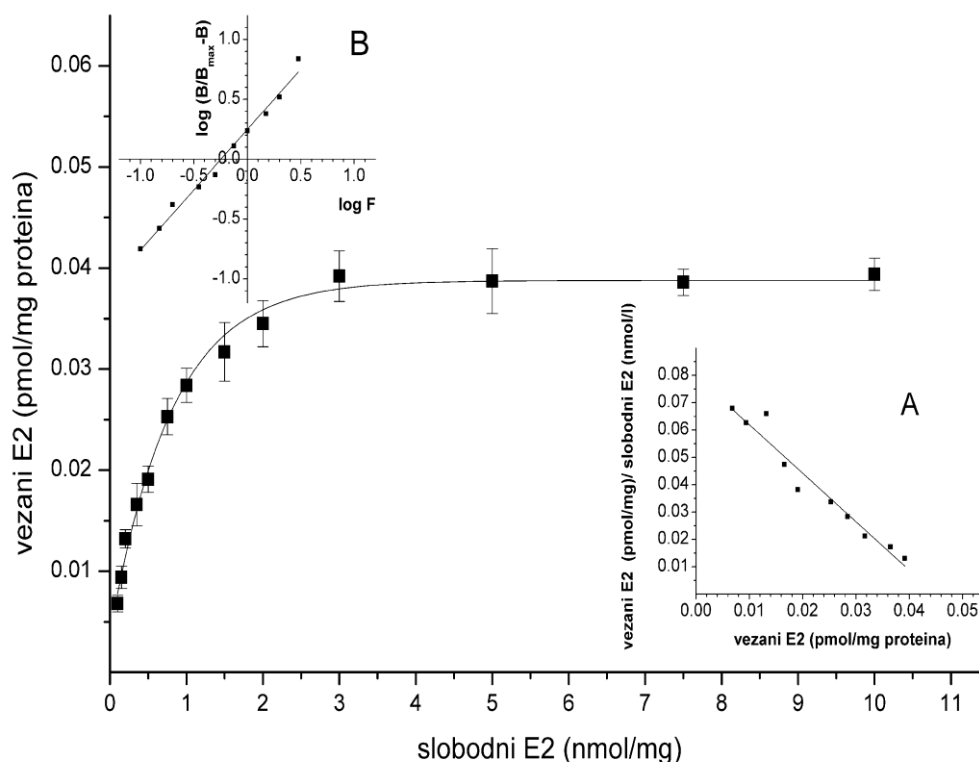
Slika 10. Specifično vezivanje estradiola za sinaptozomalne mitohondrije hipokampusa (A), kaudalnog jedra (B) i moždanog stabla (C), u zavisnosti od trajanja inkubacije sa hormonom.

Mitohondrije (0.2 mg/ml) su inkubirane u MUM u prisustvu 5×10^{-10} mol/l E2, na 22°C, 1-60 min. Količina vezanog E2, izražena u pmol po mg mitohondrijskih proteina, je izračunata na osnovu radioaktivnosti, Materijal i metode 6.. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM iz tri eksperimenta rađena u triplikatu.



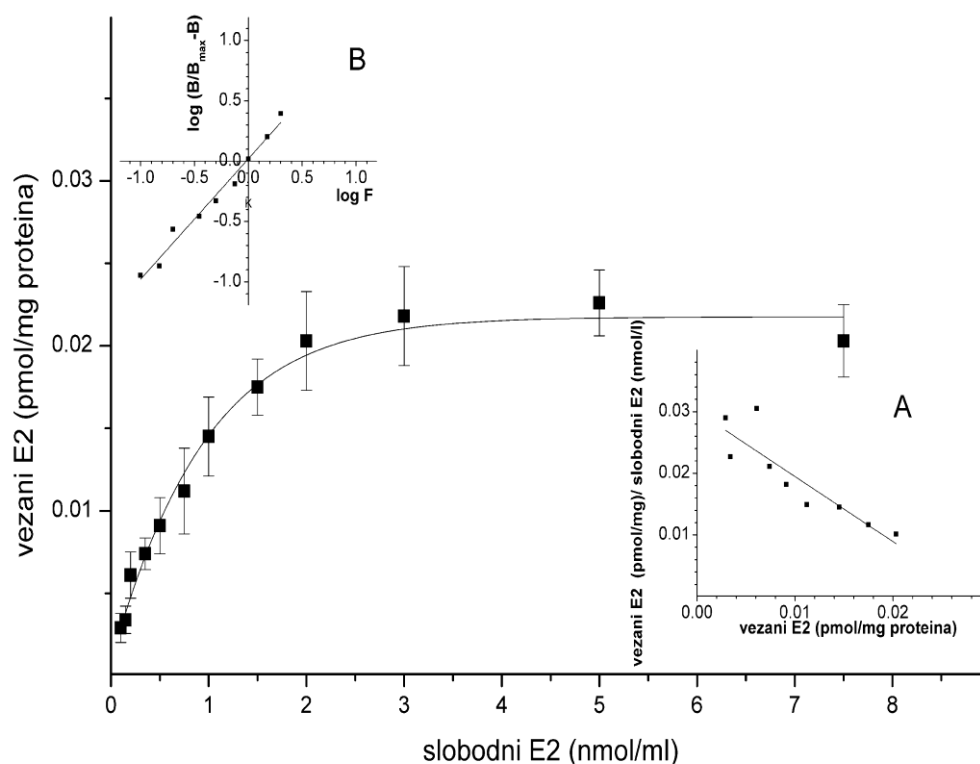
Slika 11a. Specifično vezivanje estradiola za sinaptosomalne mitohondrije izolovane iz hipokampusa, u zavisnosti od koncentracije hormona.

Mitohondrije (0.2 mg/ml) su preinkubirane u MUM, 10 min na 22°C. Nakon preinkubacije dodan je E2 u različitim koncentracijama (10^{-10} – 7.5×10^{-9} mol/l), u smešu finalne zapremine 0.2 ml i inkubacija je produžena narednih 10 min. Količina vezanog E2 je izračunata na osnovu radioaktivnosti (Materijal i metode 6.) i izražena u pmol po mg mitohondrijskih proteina. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM iz tri eksperimenta rađena u triplikatu. Umetak A je Scatchard-ov, a umetak B Hill-ov prikaz dobijenih rezultata.



Slika 11b. Specifično vezivanje estradiola za sinaptosomalne mitohondrije izolovane iz kaudalnog jedra, u zavisnosti od koncentracije hormona.

Mitohondrije (0.2 mg/ml) su preinkubirane u MUM, 10 min na 22°C. Nakon preinkubacije dodan je E2 u različitim koncentracijama (10^{-10} – 10^{-8} mol/l), u smešu finalne zapremine 0.2 ml i inkubacija je produžena narednih 10 min. Količina vezanog E2 je izračunata na osnovu radioaktivnosti (Materijal i metode 6.) i izražena u pmol po mg mitohondrijskih proteina. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM iz tri eksperimenta rađena u triplikatu. Umetak A je Scatchard-ov, a umetak B Hill-ov prikaz dobijenih rezultata.



Slika 11c. Specifično vezivanje estradiola za sinaptozomalne mitohondrije izolovane iz moždanog stabla, u zavisnosti od koncentracije hormona.

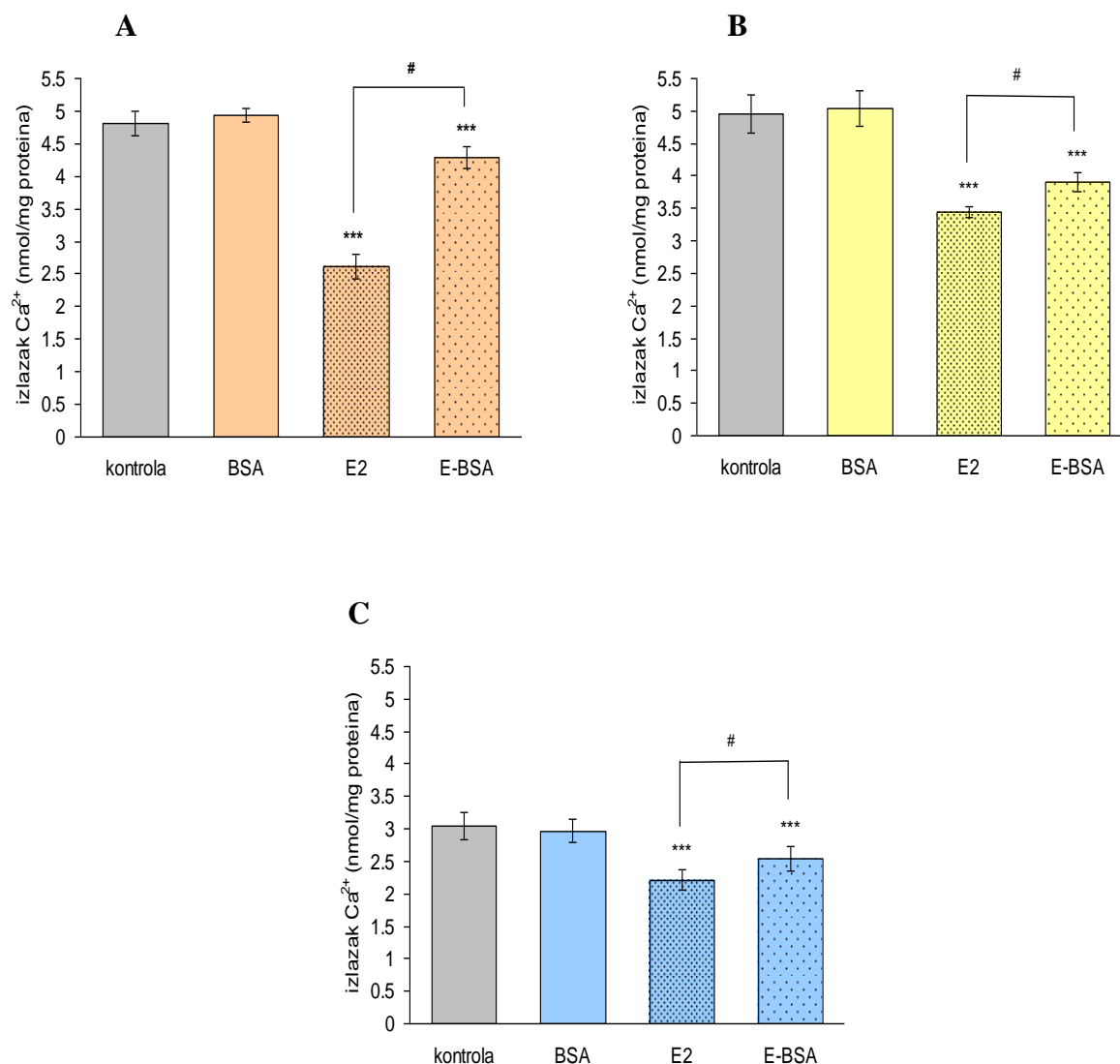
Mitohondrije (0.2 mg/ml) su preinkubirane u MUM, 10 min na 22°C. Nakon preinkubacije dodan je E2 u različitim koncentracijama (10^{-10} – 7.5×10^{-9} mol/l), u smešu finalne zapremine 0.2 ml i inkubacija je produžena narednih 10 min. Količina vezanog E2 je izračunata na osnovu radioaktivnosti (Materijal i metode 6.) i izražena u pmol po mg mitohondrijskih proteina. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM iz tri eksperimenta rađena u triplikatu. Umetak A je Scatchard-ov, a umetak B Hill-ov prikaz dobijenih rezultata.

7. Mehanizam delovanja estradiola *in vitro* na Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ iz sinaptozomalnih mitohondrija različitih regiona mozga pacova

7.1. Membranski efekat

Da bismo proverili da li estradiol utiče na Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ delujući direktno preko mitohondrijske membrane, mitohondrije napunjene sa Ca²⁺ smo pre pokretanja izlaska inkubirali sa E2 i sa E-BSA (za koga je mitohondrijska membrana nepropusna). Izlazak Ca²⁺ u kontrolnim uslovima, u prisustvu E2, BSA i E-BSA je prikazan na slici 12. U kontrolnim uslovima vrednosti izlaska su bile 4.81 ± 0.19 nmol Ca²⁺/mg proteina za Hip, 4.96 ± 0.29 nmol Ca²⁺/mg proteina za NC i 3.05 ± 0.21 nmol Ca²⁺/mg proteina za BS. U prisustvu E2 (5×10^{-10} mol/l) izmeren je izlazak od 2.61 ± 0.19 nmol Ca²⁺/mg proteina za Hip, 3.44 ± 0.08 nmol Ca²⁺/mg proteina za NC i 2.21 ± 0.16 nmol Ca²⁺/mg proteina za BS. Iz prikazanih rezultata se vidi da estradiol inhibira Na⁺-zavisni izlaska Ca²⁺ i da je ta inhibicija najveća u Hip i iznosi $54 \pm 8\%$, dok je podjednaka u NC i BS i iznosi $31 \pm 15\%$ za NC, odnosno $37 \pm 10\%$ za BS. Ovi rezultati su bili u skladu sa onima opisanim u poglavlju Rezultati 5.1. Zatim smo odredili izlazak Ca²⁺ u prisustvu E-BSA (BSA sam po sebi nije imao uticaja na izlazak) i dobili vrednosti od 4.28 ± 0.17 nmol Ca²⁺/mg proteina za Hip, 3.91 ± 0.15 nmol Ca²⁺/mg proteina za NC i 2.54 ± 0.19 nmol Ca²⁺/mg proteina za BS, što su bile vrednosti za $12 \pm 6\%$, $21 \pm 7\%$, $17 \pm 8\%$ manje u odnosu na one izmerene u Hip, NC i BS u kontrolnim uslovima. Dakle, nađeno je da i estradiol vezan sa goveđim serum albuminom inhibira izlazak Ca²⁺ iz sinaptozomalnih mitohondrija, ali da je ta inhibicija za mitohondrije izolovane iz sva tri moždana regiona, slabija u odnosu na inhibiciju sa slobodnim estradiolom.

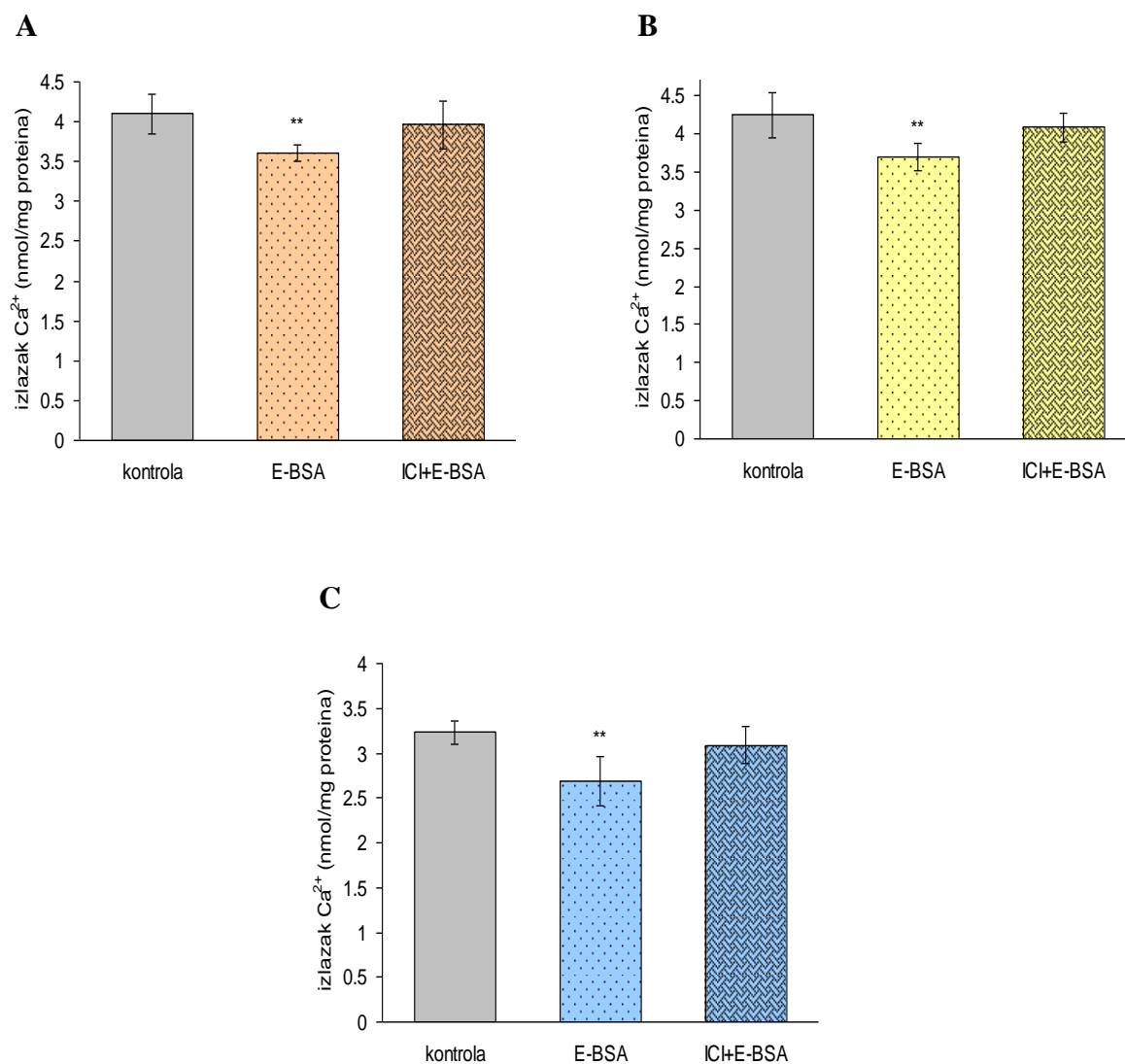
Dobijeni rezultati ukazivali su na postojanje direktnog membranskog efekta estradiola, tj. da do 20% inhibicije izlaska Ca²⁺ zavisi od spoljašnjih vezujućih mesta na mitohondrijskoj membrani. Međutim, u eksperimentima sa E-BSA u prisutvu neselektivnog antagoniste estradiolskih receptora, ICI 182,780, dobijeni su drugačiji rezultati, Slika 13. Vrednosti izlaska Ca²⁺ u prisustvu ICI 182,780 i E-BSA su bile $97 \pm 2\%$ za Hip, $96 \pm 4\%$ za NC i $96 \pm 5\%$ za BS, u odnosu na kontrolu, što je značilo da je prisustvo ICI 182,780 u potpunosti eliminisalo inhibitorski efekat E-BSA na izlaska Ca²⁺ u svim ispitivanim regionima.



Slika 12. Uticaj estradiola i estradiola vezanog sa goveđim serum albuminom na Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ iz sinaptosomalnih mitohondrija hipokampusa (A), kaudalnog jedra (B) i moždanog stabla (C).

Mitohondrije (0.2 mg/ml) su preinkubirane u MUM, 10 min na 22°C, a zatim su unosile Ca²⁺ tokom 5 min inkubacije sa 200 μmol/l CaCl₂ (0.7 μCi ⁴⁵CaCl₂). Ulazak Ca²⁺ je zaustavljan dodavanjem 0.01 mol/l rutenijum red. Inkubacija je nastavljena u prisustvu 5 x 10⁻¹⁰ mol/l E2 ili E-BSA (koncentracija E2 5 x 10⁻¹⁰ mol/l). Nakon 10 minuta Na⁺-zavisni izlazak je pokretan dodavanjem 100 mmol/l NaCl i 0.2 mmol/l EDTA i trajao je 5 min. Uneti Ca²⁺ i količina Ca²⁺ koji je izašao iz mitohondrija su određivani kako je opisano u Materijal i metode 6.2.1. Rezultatima su prikazane srednje vrednosti ± SEM četiri eksperimenta rađena u triplikatu.

*** Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, p < 0.001. # Statistički značajna razlika između tretmana E2 i E-BSA, p < 0.05.



Slika 13. Efekat ICI 182,780 na uticaj estradiola vezanog sa goveđim serum albuminom na Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ iz sinaptozomalnih mitohondrija hipokampusa (A), kaudalnog jedra (B) i moždanog stabla (C).

Mitohondrije (0.2 mg/ml) su preinkubirane u MUM, 10 min na 22°C, a zatim su unosile Ca²⁺ tokom 5 min inkubacije sa 200 μmol/l CaCl₂ (0.7 μCi ⁴⁵CaCl₂). Ulazak Ca²⁺ je zaustavljan dodavanjem 0.01 mol/l rutenijum red. Narednih 20 min mitohondrije su inkubirane u odsustvu ili prisustvu antagoniste ER, ICI 182,780 (10⁻⁶ mol/l), a zatim je dodan E-BSA (koncentracija E2 5 × 10⁻¹⁰ mol/l). Nakon 10 minuta Na⁺-zavisni izlazak je pokretan dodavanjem 100 mmol/l NaCl i 0.2 mmol/l EDTA i trajao je 5 min. Uneti Ca²⁺ i količina Ca²⁺ koji je izašao iz mitohondrija su određivani kako je opisano u Materijal i metode 6.2.1. Rezultatima su prikazane srednje vrednosti ± SEM četiri eksperimenta rađena u triplikatu. ** Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, p < 0.01.

S obzirom da su nam prethodni rezultati pokazali da estradiol nije ispoljio svoj efekat delujući direktno na mitohondrijsku membranu tj. na $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivač, dalji rad je bio usmeren ka ispitivanju efekata estradiola preko mitohondrijskih estradiolskih receptora (mtER).

7.2. Uloga mitohondrijskih estradiolskih receptora u modulaciji izlaska Ca^{2+} pod delovanjem estradiola

7.2.1. Imunoblot analiza ekspresije ER α i ER β

U cilju dokazivanja prisustva ER α i ER β rađena je Western blot analiza naših mitohondrijskih preparata (ukupne mitohondrije). U sinaptosomalnim mitohondrijama izolovanim iz sva tri ispitivana regiona detektovane su trake od približno 65 i 55 kDa, koje odgovaraju ER α i ER β , čime je dokazano prisustvo tih receptora, Slika 14.

7.2.2 Efekat antagoniste estradiolskih receptora, ICI 182,780, na inhibiciju Na^+ -zavisnog izlaska Ca^{2+} pod delovanjem estradiola

Ulogu ER α i ER β u modulaciji izlaska Ca^{2+} iz sinaptosomalnih mitohondrija pod delovanjem estradiola, smo ispitivali korišćenjem neselektivnog antagoniste estradiolskih receptora, ICI 182,780. Kada se u eksperimentalnoj smeši nalazio ICI 182,780 inhibicija izlazak Ca^{2+} iz mitohondrija sa estradiolom je bila $13 \pm 3\%$ za Hip, $15 \pm 6\%$ za NC i $13 \pm 9\%$ za BS, Slika 15. Dakle, pokazano je da u sva tri moždana regiona, pretretman mitohondrija napunjenih kalcijumom sa ICI 182,780 značajno smanjuje inhibitorni efekat E2 na Na^+ -zavisni izlazak Ca^{2+} , u poređenju sa inhibitornim efektom E2 kada nije dodavan antagonista. Efekat ICI 182,780 je bio najizraženiji u Hip gde je E2-inhibicija smanjena sa $54 \pm 8\%$ (poglavlje Rezultati 7.1.) na $\sim 13\%$.

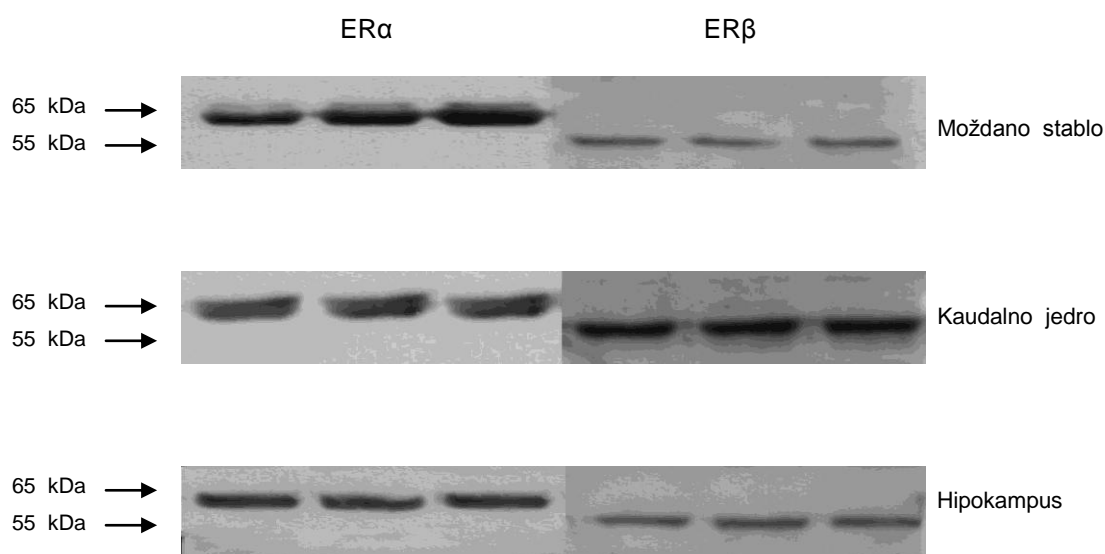
Prethodnim rezultatima opisan efekat antagoniste estradiolskih receptora na inhibiciju mitohondrijskog izlaska Ca^{2+} sa estradiolom je ukazivao na ulogu tih receptora, zato smo u daljem radu želeli da ispitamo koji od receptora ER α i/ili ER β je uključen u pomenutu modulaciju.

7.2.3. Uticaj specifičnih agonista estradiolskih receptora, PPT i DPN, na Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺

Primenom specifičnih agonista, PPT za ER α i DPN za ER β , ispitivali smo njihovu pojedinačnu ulogu u inhibiciji mitohondrijskog izlaska Ca²⁺, Slika 16. U prisustvu DPN, agoniste ER β , došlo je do značajne inhibicije izlaska Ca²⁺ iz mitohondrija sva tri regiona. Izlazak je smanjen za 42 \pm 6% iz mitohondrija Hip, za 25 \pm 6% iz mitohondrija NC i za 21 \pm 2% iz mitohondrija BS, u odnosu na kontrolne vrednosti. U prisustvu PPT izlazak Ca²⁺ je smanjen za 6 \pm 3% za Hip, 9 \pm 7% za NC i za 12 \pm 8% za BS, u odnosu na kontrolne vrednosti. Ovi rezultati su pokazali da je u sva tri regiona dominantnija uloga izoforme β estradiolskog receptora u odnosu na izoformu α (u hipokampusu gotovo sva inhibicija ide preko ER β), u inhibiciji mitohondrijskog izlaska Ca²⁺ pod delovanjem estradiola.

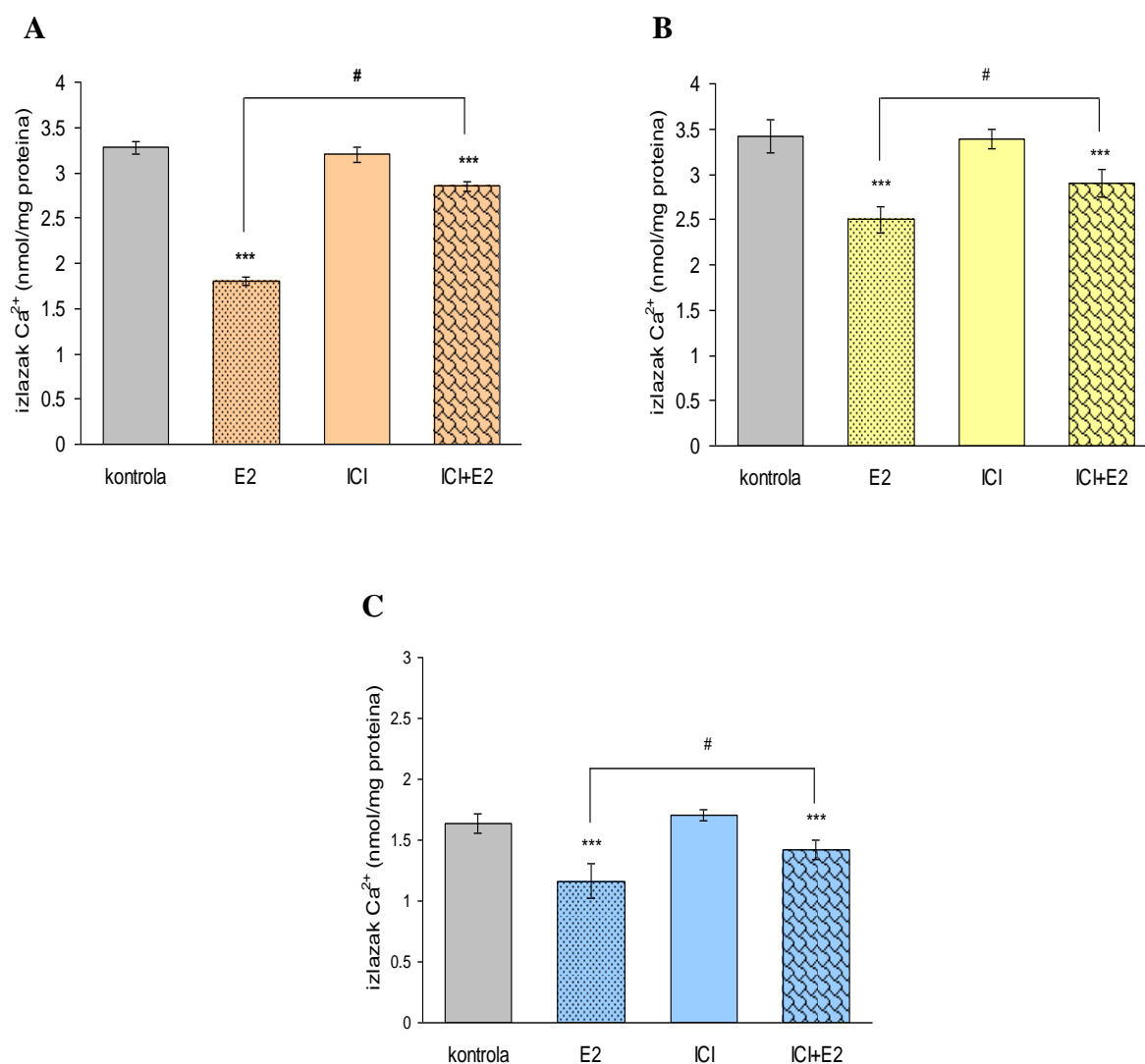
7.2.4. Uticaj inhibitora mitohondrijskog Na⁺/Ca²⁺-izmenjivača, CGP 37157, na Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ iz sinaptosomalnih mitohondrija i uloga ER α i/ili ER β

Da bismo utvrdili da li je efekat estradiola na izlazak Ca²⁺ posledica direktnog delovanja kompleksa estradiola sa estradiolskim receptorom (E \cdot ER) na mitohondrijski Na⁺/Ca²⁺-izmenjivač, pratili smo izlazak Ca²⁺ u prisustvu inhibitora izmenjivača, CGP 37157, kao i efekte pretretmana sa E2, DPN i PPT. Rezultati ovih eksperimenata predstavljeni su na slici 17. U prisustvu CGP 37157 izmerene su veoma male vrednosti izlaska Ca²⁺ (0.34 \pm 0.07 nmol Ca²⁺/mg proteina za Hip, 0.31 \pm 0.12 nmol Ca²⁺/mg proteina za NC, 0.20 \pm 0.045 nmol Ca²⁺/mg proteina za BS) koje su predstavljale za Hip i NC za 6 \pm 2% i za BS 8 \pm 2% vrednosti dobijenih u kontrolnim uslovima. Kada su mitohondrije inkubirane sa E2 pre dodavanja CGP 37157, izmeren je izlazak od 0.89 \pm 0.09 nmol Ca²⁺/mg proteina za Hip, 0.80 \pm 0.04 nmol Ca²⁺/mg proteina za NC i 0.83 \pm 0.14 nmol Ca²⁺/mg proteina za BS, što je bilo za Hip 15 \pm 4%, za NC 16 \pm 4% i za BS 32 \pm 7% vrednosti izlaska dobijenih u kontrolnim uslovima. Uočeno je da je pretretman sa estradiolom doveo do značajnog smanjenja inhibitornog delovanja CGP 37157 na izlazak Ca²⁺ iz mitohondrija sva tri ispitivana regiona (s najizraženijim efektom u BS), što je ukazivalo na direktan efekat na mitohondrijski Na⁺/Ca²⁺-izmenjivač. Sličan efekat je dobijen i preinkubacijom mitohondrija sa DPN pre dodavanja CGP 37157, kada su vrednosti izlaska Ca²⁺ bile za Hip 13 \pm 4%, za NC 14 \pm 6% i za BS 26 \pm 2% u odnosu na one izmerene u kontrolnim uslovima, dok pretretman sa PPT nije imao efekta.



Slika 14. Detekcija ER α i ER β u sinaptosomalnim mitohondrijama izolovanim iz moždanog stabla, kaudalnog jedra i hipokampusu.

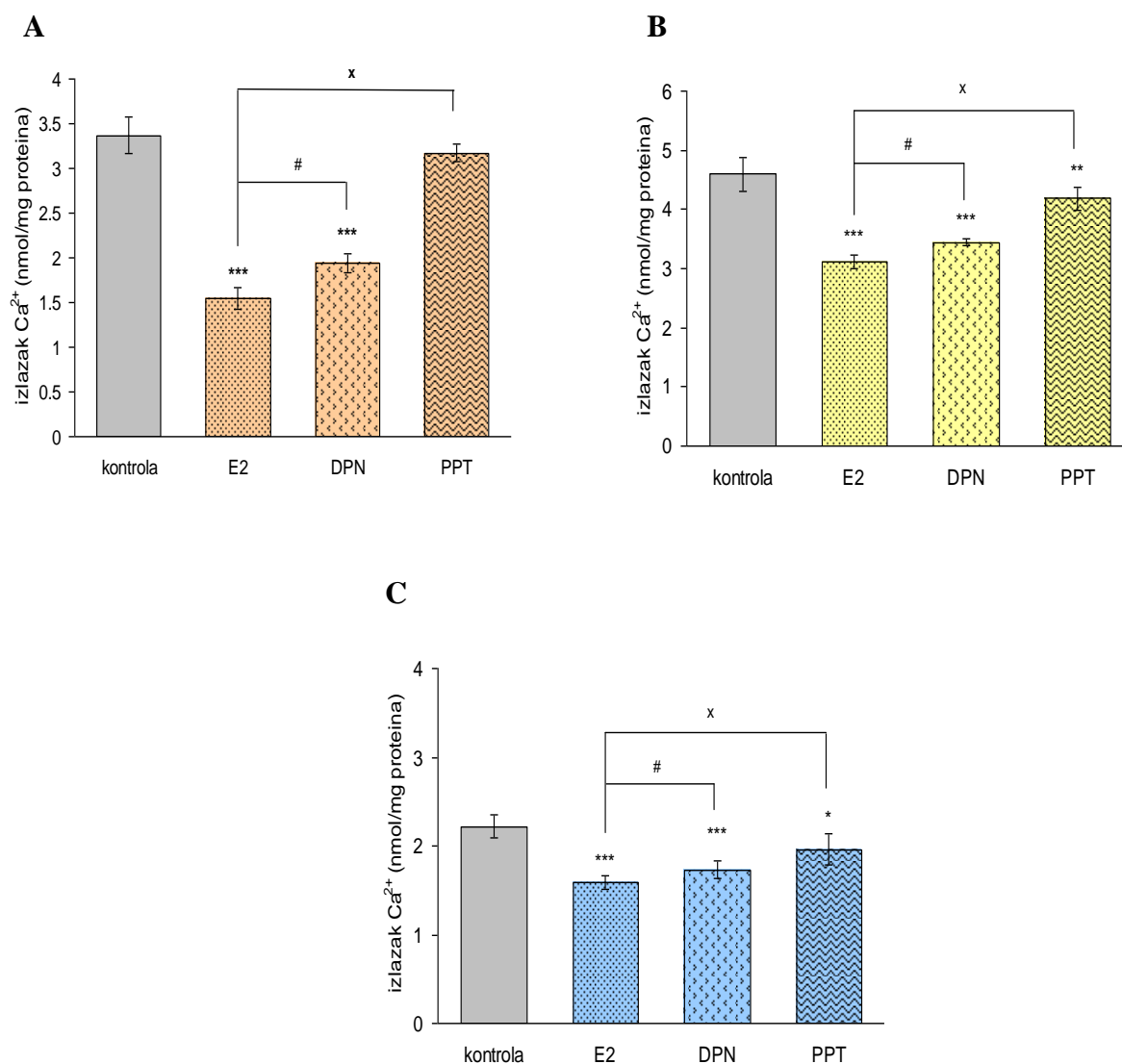
Reprezentativni snimci imunoblota urađenog sa anti ER α i anti ER β antitelom na uzorcima sinaptosomalnih mitohondrija izolovanih iz BS, NC i Hip ovarijektomisanih pacova (po tri zasebna izolata za svaki region). Uzorci su pripremljeni za Western blot analizu kako je opisano u Materijal i metode 10. Bunarići su nalivani sa 40 μ g proteina. Antitelo na ER α na imunoblotu daje specifičnu traku na ~65 kDa, a antitelo na ER β na ~55 kDa. Imunoreaktivne trake su postale vidljive reakcijom Luminola sa HRP na sekundarnom antitelu, usled koje se emituje signal prenosiv na fotografski film.



Slika 15. Uloga estradiolskih receptora u modulaciji izlaska Ca²⁺ iz sinaptozomalnih mitohondrija hipokampusa (A), kaudalnog jedra (B) i moždanog stabla (C).

Sinaptozomalne mitohondrije, prethodno napunjene sa Ca²⁺, su inkubirane 20 min na 22°C u prisustvu nespecifičnog antagoniste ER, ICI 182,780 (10⁻⁶ mol/l). Inkubacija je nastavljena narednih 10 min u odsustvu ili prisustvu 5 x 10⁻¹⁰ mol/l E2. Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ je pokretan dodavanjem 100 mmol/l NaCl i 0.2 mmol/l EDTA i trajao je 5 min. Uneti Ca²⁺ i količina Ca²⁺ koji je izašao iz mitohondrija su određivani kako je opisano u Materijal i metode 6.2.1. Rezultatima su prikazane srednje vrednosti ± SEM tri eksperimenta rađena u triplikatu.

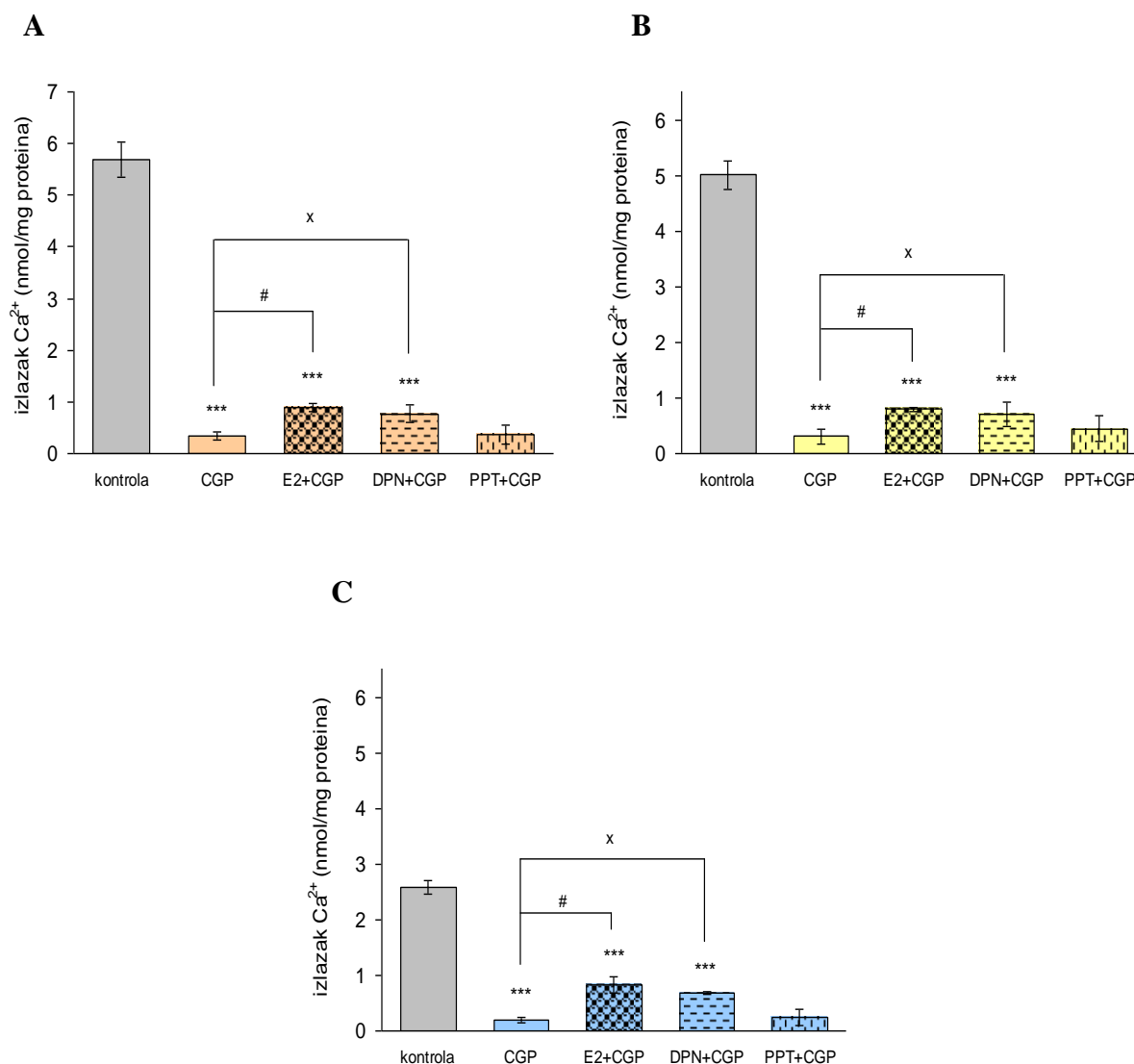
*** Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, p < 0.001. # Statistički značajna razlika između tretmana E2 i ICI+E2, p < 0.001.



Slika 16. Pojedinačna uloga $ER\alpha$ i $ER\beta$ u modulaciji izlaska Ca^{2+} iz sinaptozomalnih mitohondrija hipokampusa (A), kaudalnog jedra (B) i moždanog stabla (C).

Sinaptozomalne mitohondrije, prethodno napunjene sa Ca^{2+} , su inkubirane 10 min na $22^{\circ}C$ u odsustvu ili prisustvu 5×10^{-10} mol/l E2, u prisustvu specifičnog agoniste $ER\alpha$, PPT (10^{-8} mol/l) ili specifičnog agoniste $ER\beta$, DPN (10^{-8} mol/l). Na^{+} -zavisni izlazak Ca^{2+} je pokretan dodavanjem 100 mmol/l NaCl i 0.2 mmol/l EDTA i trajao je 5 min. Uneti Ca^{2+} i količina Ca^{2+} koji je izašao iz mitohondrija su određivani kako je opisano u Materijal i metode 6.2.1. Rezultatima su prikazane srednje vrednosti \pm SEM tri eksperimenta rađena u triplicatu.

*** Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, $p < 0.001$. # Statistički značajna razlika između tretmana E2 i DPN, $p < 0.05$ za BS, $p < 0.001$ za Hip i NC. x Statistički značajna razlika između tretmana E2 i PPT, $p < 0.001$.



Slika 17. Uticaj CGP 37157 na Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ iz sinaptosomalnih mitohondrija hipokampusa (A), kaudalnog jedra (B) i moždanog stabla (C), uloga ER α i/ili ER β .

Sinaptosomalne mitohondrije, prethodno napunjene sa Ca²⁺, su inkubirane 10 min na 22°C u odsustvu E2, u prisustvu E2 (5 x 10⁻¹⁰ mol/l), u prisustvu specifičnog agoniste ER α , PPT (10⁻⁸ mol/l) ili u prisustvu specifičnog agoniste ER β , DPN (10⁻⁸ mol/l). Inkubacija je nastavljena naredna 3 min u odsustvu ili prisustvu inhibitora Na⁺/Ca²⁺-izmenjivača, CGP 37157 (10⁻⁶ mol/l). Na⁺-zavisni izlazak Ca²⁺ je pokretan dodavanjem 100 mmol/l NaCl i 0.2 mmol/l EDTA i trajao je 5 min. Uneti Ca²⁺ i količina Ca²⁺ koji je izašao iz mitohondrija su određivani kako je opisano u Materijal i metode 6.2.1. Rezultatima su prikazane srednje vrednosti \pm SEM tri eksperimenta rađena u triplikatu. *** Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, p < 0.001. # Statistički značajna razlika između tretmana CGP i E2+CGP, p < 0.001. x Statistički značajna razlika između tretmana CGP i DPN+CGP, p < 0.05 za Hip i NC, p < 0.001 za BS.

Na osnovu opisanog smo zaključili da bi efekat estradiola na izlazak Ca^{2+} iz mitohondrija mogao biti posledica direktnog delovanja kompleksa estradiola sa estradiolskim receptorom (E-ER) na mitohondrijski $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivač (mtNCX), pri čemu dobijeni rezultati ukazuju na značajnu ulogu $\text{ER}\beta$.

V DISKUSIJA

Jonizovani slobodni kalcijum (Ca^{2+}) ima važnu signalnu ulogu u povezivanju različitih vanćelijskih stimulusa i njihovih unutarćelijskih odgovora. Pored toga što reguliše procese od opšteg fiziološkog značaja uključujući proizvodnju ATP-a, procesiranje proteina i ekspresiju gena, Ca^{2+} utiče i na specifične ćelijske funkcije kao što su rast neurita, oslobađanje neurotransmitera i stvaranje akcionog potencijala u neuronima. Dobro je poznato da ključnu ulogu u redistribuciji unutarćelijskog Ca^{2+} , tokom i nakon prolaska nervnog impulsa, imaju mitohondrije (Colegrove i sar., 2000). U ovoj tezi smo se bavili izučavanjem uticaja gonadnog steroidnog hormon estradiola (E2) na mitohondrijske mehanizme za transport Ca^{2+} , a time i na funkciju mitohondrija u održavanju ukupne ćelijske Ca^{2+} -homeostaze u neuronima. Iako se većina ranijih studija koje se odnose na ispitivanje uticaja estradiola na CNS bavila hipotalamusom, kao regionom direktno povezanim sa regulacijom reproduktivnih funkcija, danas je dobro poznato da E2 deluje i na druge moždane regione, preko kojih utiče na važne nervne funkcije kao što su raspoloženje, pamćenje i sazajne funkcije (Moss i Gu, 1999; Toran-Allerand i sar., 2005; Vasudevan i Pfaff, 2008). Osim toga E2 ima i neuroprotektivnu ulogu jer doprinosi stabilizaciji strukture i funkcije nervnih ćelija u uslovima delovanja različitih neurotoksičnih agenasa (Garcia-Segura i sar., 2001). Značajan deo neuroprotektivnih efekata estradiola se ostvaruje preko mitohondrija, bilo da se radi o direktnom delovanju preko E2-

vezujućih mesta ili indirektnom delovanju preko regulacije signalne transdukcije i antiapoptotskih faktora (Singh i sar., 2006). Rezultati prikazani u ovoj tezi po prvi put ukazuju na uticaj estradiola na transport Ca^{2+} iz mitohondrija određenih ekstrapitalamičkih regiona mozga ovarijektomisanih (OVX) ženki pacova, kao i na mogući mehanizam delovanja estradiola na $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivač u izolovanim sinaptosomalnim mitohondrijama.

U prvoj fazi eksperimentalnog rada ispitana je prečišćenost mitohondrijskih preparata i aktivnost F_0F_1 -ATPaze u uzorcima sinaptosomalnih mitohondrija izolovanih iz hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla. F_0F_1 -ATPaza je izabrana za ispitivanje jer se radi o enzimu koji je prisutan isključivo na mitohondrijama. Pokazano je da je udeo F_0F_1 -ATPaze u ukupnoj fosfataznoj aktivnosti izmerenoj u našim uzorcima bio veći od 82%, u sva tri ispitivana regiona, na osnovu čega je zaključeno da je prečišćenost mitohondrijskih preparata zadovoljavajuća za dalji rad. Iz literature je poznato da F_0F_1 -ATPaza poseduje E2-vezujuće mesto (Kipp i Ramirez, 2001; Muller i Gruber, 2003). Oslanjajući se na taj podatak ispitivali smo uticaj endogeno prisutnih gonadnih hormona na aktivnost ovog enzima u sinaptosomalnim mitohondrijama izolovanim iz intaktnih jedinki u različitim fazama estrusnog ciklusa i jedinki sa suprimiranim gonadnim hormonima (OVX). U serumu OVX jedinki je tri nedelje nakon ovarijektomije izmerena koncentracija estradiola niža od 1.5 pg/ml (< 5 pmol/l), što je 10 do 45 puta manje od one kod intaktnih ženki (Haim i sar., 2003); ovde treba napomenuti da se hroničnim uklanjanjem jajnika vrši suprimacija i drugog ženskog gonadnog hormona, progesterona. S obzirom da je kod OVX životinja nađen značajan porast aktivnosti F_0F_1 -ATPaze (45-70%) u odnosu na intaktne ženke u različitim fazama ciklusa, došlo se do zaključka da endogeno prisutni gonadni hormoni imaju inhibirajući efekat na aktivnost tog enzima. S druge strane, iako kod ciklirajućih ženki koncentracija E2 u serumu varira od 15 do 70 pg/ml (Haim i sar., 2003), nema značajnih razlika u aktivnosti F_0F_1 -ATPaze između različitih faza estrusnog ciklusa, što govori da fiziološke fluktuacije estradiola ne utiču na aktivnost F_0F_1 -ATPaze.

U daljem radu ispitivali smo aktivnost ovog enzima u sinaptosomalnim mitohondrijama izolovanim iz Hip, NC, i BS, ovarijektomisanih životinja. Pokazano je da je ta aktivnost podjednaka u sva tri ispitivana regiona, Slika 2. Ispitivanje uticaja estradiola na aktivnost F_0F_1 -ATPaze u *in vitro* uslovima je pokazalo da fiziološke koncentracije E2 (srednja vrednost koncentracije E2 u cirkulaciji je 10^{-10} mol/l) ne utiču na aktivnost F_0F_1 -ATPaze, i da tek

koncentracije veće od 10^{-7} mol/l dovode do značajne inhibicije, što je nalaz u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima na mitohondrijama mozga (Kipp i Ramirez, 2001). Budući da se u tako visokim koncentracijama ($\geq 10^{-7}$ mol/l) estradiol nespecifično vezuje za membranu i narušava njenu strukturu i funkciju (de Boer i Notides, 1981; Leshchenko, 1987; Custodio, 1991) bilo je opravdano zaključiti da se, kada je u pitanju uticaj na F_0F_1 -ATPazu, ne radi o specifičnom delovanju tog hormona. Dakle, suprotno očekivanjima, nije nađen efekat fizioloških koncentracija estradiola na aktivnost F_0F_1 -ATPaze, iz čega se moglo pretpostaviti da razliku u aktivnosti tog enzima u intaktnim i OVX jedinkama određuje drugi gonadni hormon, progesteron. Ispitivanje uloge progesterona je prevazilazilo okvire istraživanja predviđenih ovom tezom, pa smo došavši do ovakvog rezultata ujedno završili analizu našeg mitohondrijskog preparata praćenjem F_0F_1 -ATPazne aktivnosti.

Efekat estradiola na mitohondrijski transport Ca^{2+}

U uvodu je dosta rečeno o ulozi Ca^{2+} u regulaciji širokog spektra ćelijskih funkcija. Posebno je istaknut značaj akumulacije Ca^{2+} u mitohondrijama za regulaciju koncentracije Ca^{2+} u citosolu ($[Ca]_i$) i normalno funkcionisanje nervnih ćelija. Prikupljanje Ca^{2+} u mitohondrijama u najvećoj meri zavisi od ulaska Ca^{2+} radom rutenijum red-osetljivog uniportera (RU) i od izlaska Ca^{2+} iz mitohondrija aktivnošću mitohondrijskog Na^+/Ca^{2+} -izmenjivača (mtNCX). Ta dva mehanizma omogućavaju mitohondrijama da se ponašaju kao privremeni odvođivači suvišnog Ca^{2+} u situacijama porasta $[Ca^{2+}]_i$ preko okvira fiziološke tolerancije, i da postepeno otpuštaju Ca^{2+} kada se $[Ca^{2+}]_i$ spusti ispod tih okvira (Nicholls, 1978). U nameri da proverimo da li postoji modulatorni uticaj E2 *in vitro* na ulazak Ca^{2+} u mitohondrije kroz RU i izlazak Ca^{2+} iz mitohondrija preko mtNCX, ispitivali smo aktivnost ovih mehanizama u mitohondrijama izolovanim iz nervnih završetaka (sinaptozoma) hipokampusu, kaudalnog jedra i moždanog stabla ovarijektomisanih ženki pacova.

Prvi dobijeni rezultati odnosili su se na ulazak Ca^{2+} u kontrolnim uslovima, tj. u uslovima optimalnim za aktivnost rutenijum red-osetljivog uniportera, ranije određenim za sinaptozomalne mitohondrije celog mozga (Horvat i sar., 2001). Ustanovili smo da mitohondrije sva tri moždana regiona pokazuju sličnu sposobnost akumulacije Ca^{2+} koja je, izraženo u nmol Ca^{2+} /mg proteina, iznosila: 4.81 ± 0.23 za Hip, 5.25 ± 0.14 za NC i 3.07 ± 0.29 za BS. U odnosu na literaturne podatke o akumulaciji Ca^{2+} u mitohondrijama, vrednosti dobijene u našim eksperimentalnim uslovima su za red do dva reda veličine manje. Ovu

razliku je verovatno moguće objasniti time da se drugi radovi odnose na mitohondrije iz nervnih ćelija pogođenih neurodegenerativnim promenama, iz genetski izmenjenih ćelija (transfektovani neuroni) ili iz ćelija drugih tkiva (jetra, srce), što samo po sebi može dovesti do razlike u aktivnosti Ca^{2+} -transportnih mehanizama (Gellerich i sar., 2008; Murphy i sar., 1996; Carafoli i sar., 1964; Lin i sar., 2007). Pored toga, moguća je i razlika u osetljivosti metoda za detekciju Ca^{2+} . U našem radu korišćen je radioaktivno obeleženi Ca^{2+} , dok su u pomenutim studijama korišćene Ca^{2+} -osetljive fluorescentne boje i Ca^{2+} -selektivne elektrode.

Kad je u pitanju modulacija mitohondrijskog unosa Ca^{2+} pod delovanjem estradiola, praćenjem dozno-zavisnog efekta, našli smo da fiziološke koncentracije E2 nemaju modulacioni uticaj na ulazak Ca^{2+} u sinaptosomalne mitohondrije izolovane iz Hip, NC i BS. Uočeni stimulatorni efekat visokih koncentracija estradiola ($\geq 10^{-6}$ mol/l) nastaje usled ugradnje lipofilnih molekula hormona u samu mitohondrijsku membranu, čime se menja njena viskoznost i permeabilnost i na taj način neselektivno moduliše aktivnost membranski-lociranih transportnih proteina (de Boer i Notides, 1981; Lukyanova i sar. 1994). Našim ranijim studijama, na sinaptosomalnim mitohondrijama celog mozga takođe nije detektovan specifični efekat estradiola na ulazak Ca^{2+} (Horvat i sar., 2001). Pokazano je da E2 redukuje stimulatorni efekat 3-nitropropionske kiseline (3NPA) i H_2O_2 na ulazak Ca^{2+} u mitohondrije nervnih ćelija (Simpkins i sar., 2005). Tretman sa estradiolom smanjuje ekscitotoksične efekte glutamata, tako što stimuliše ulazak Ca^{2+} u mitohondrije hipokampalnih neurona i ekspresiju antiapoptotskog faktora Bcl-2, koji onda povećava toleranciju mitohondrija na povišenu koncentraciju Ca^{2+} u matriksu ($[\text{Ca}^{2+}]_m$). (Nilsen i Brinton, 2003). U HeLa ćelijama E2, kao i drugi agonisti estradiolskih receptora (diethylstilbestrol i PPT), aktiviraju unos Ca^{2+} u mitohondrije (Lobaton i sar., 2005). Parkash i saradnici (2006) u svom radu na MCF7 ćelijama govore o heterogenosti mitohondrija u odnosu na delovanje estradiola. Estradiol stimuliše unos Ca^{2+} i dovodi do porasta $[\text{Ca}^{2+}]_m$ u mitohondrijama sa visokim kapacitetom za Ca^{2+} , dok takav efekat izostaje u mitohondrijama sa niskim kapacitetom (Parkash i sar., 2006). Takođe je uočen porast $[\text{Ca}^{2+}]_m$ moždanih ćelija i ćelija primarnih tubula bubrega pacova, koji je posledica porasta koncentracije Ca^{2+} u citosolu pod delovanjem estradiola (Garcia i sar., 1996; Han i sar., 2000). Ako poredimo navedene efekte sa našim rezultatima gde je konstatovan izostanak direktnog uticaja E2 na aktivnost rutenijum red-osetljivih uniportera i ulazak Ca^{2+} u sinaptosomalne mitohondrije, primećenu razliku možemo objasniti time i) da su navedeni

efekti nađeni na mitohondrijama *in situ* (unutar ćelija), dok su naši eksperimenti rađeni na izolovanim mitohondrijama. Dobro je poznato da E2 može indirektno, delujući na nivou ćelijske membrane, dovesti do porasta $[Ca^{2+}]_m$ (Nikezić i sar., 1996; Benten i sar., 1998; Han i sar., 2000); ii) da su navedeni efekti estradiola na mitohondrijski unos Ca^{2+} nađeni u uslovima izloženosti mitohondrija različitim citotoksičnim agensima, što nije bio slučaj u našim eksperimentima, u kojima smo unos Ca^{2+} u mitohondrije pratili u fiziološkim uslovima.

Da bismo proverili da li estradiol ima efekta na ulazak Ca^{2+} u izolovane sinaptosomalne mitohondrije određenih regiona mozga u uslovima narušenog potencijala mitohondrijske membrane ($\Delta\Psi_m$), kao agens koji moduliše $\Delta\Psi_m$ koristili smo FCCP. Zahvaljujući svojim malim amfipatskim molekulima (poseduju hidrofoban i hidrofilan kraj) FCCP se ugrađuje u fosfolipidni dvosloj i direktno povećava propustljivost mitohondrijske membrane za protone, time se raskida veza između elektron-transportnog lanca i sinteze ATP-a, dolazi do inhibicije oksidativne fosforilacije i gubitka $\Delta\Psi_m$. Efekat FCCP je potvrđen i u našim eksperimentima, detekcijom depolarizacije mitohondrijske membrane i izlaska rodamina 123 (RH 123) iz mitohondrija u prisustvu tog agensa. Međutim, kada su mitohondrije bile tretirane sa estradiolom pre dodavanja FCCP, došlo je do inhibicije izlaska RH 123, što je ukazivalo na očuvanost $\Delta\Psi_m$ u prisustvu estradiola. Sličan protektivan efekat E2 na potencijal mitohondrijske membrane je dokumentovan u literaturi kada je kolaps $\Delta\Psi_m$ izazvan antimicinom (Nilsen i Brinton, 2003) ili sa 3NPA (Simpkins i sar., 2005) u neuronima hipokampusa. Protektivni efekat 17α -estradiola je utvrđen u neuronima nakon ishemije, gde hormon stabilise mitohondrijsku respiraciju i potencijala mitohondrijske membrane (Morin i sar., 2002). Kao protektivno delovanje estradiola se opisuju i inhibicija produkcije H_2O_2 i stabilizacija $\Delta\Psi_m$ u mitohondrijama neuroblastoma SK-N-SH ćelija i mitohondrijama jetre (Wang i sar., 2006; Borrás i sar., 2010), kao i inhibicija tranzicionih pora na izolovanim mitohondrijama jetre i srca pod delovanjem estradiola (Borrás i sar., 2010; Bopassa i sar., 2010). Štaviše, u skorijem radu na mitohondrijama izolovanim iz mozga mužjaka pacova, Borrás i saradnici su detektovali E2-indukovani porast potencijala mitohondrijske membrane od 45% i u fiziološkim uslovima (Borrás i sar., 2010).

S obzirom da je aktivnost rutenijum red-osetljivog uniportera ovisna o potencijalu mitohondrijske membrane i da je zaustavlja njena depolarizacija (Nunez i sar., 2006), u nastavku istraživanja pratili smo unos Ca^{2+} u mitohondrije u uslovima narušenog $\Delta\Psi_m$

tretmanom sa FCCP. Potvrđeno je da u svim ispitivanim regionima FCCP inhibira ulazak Ca^{2+} oko 90%. Međutim, pretretman mitohondrija sa estradiolom, u svim ispitivanim regionima povećava ulazak Ca^{2+} za 2 do 3 puta u odnosu na onaj izmeren samo sa FCCP. Sve to zajedno ukazuje da estradiol, prevencijom kolapsa potencijala mitohondrijske membrane, ostvaruje stimulatorni efekat na aktivnost mehanizama za unos Ca^{2+} u mitohondrije. Sličan zaključak srećemo i u radu Simpkins-a i saradnika na mitohondrijama SHSY-5Y neuroblastoma ćelija gajenih u kulturi (Simpkins i sar., 2005). Dodatno, stabilizacijom $\Delta\Psi_m$, E2 sprečava i oslobađanje mitohondrijskih proapoptotskih faktora (Green i sar., 2004; Borrás i sar., 2010), što je još jedan pokazatelj stabilizacije mitohondrijskih i ćelijskih funkcija u prisustvu tog hormona.

Izostanak direktnog efekta estradiola na ulazak Ca^{2+} u mitohondrije, usmerio je našu pažnju na proces izlaska Ca^{2+} iz mitohondrija. Pratili smo aktivnost glavnog mehanizma za izlazak Ca^{2+} iz mitohondrija nervnih ćelija, mitohondrijskog $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača (mtNCX). Kao što je detaljnije objašnjeno u uvodu, mtNCX su proteini locirani na unutrašnjoj membrani mitohondrija koji istovremeno sa transportom Ca^{2+} iz mitohondrija transportuju Na^+ u suprotnom smeru, i njihova je aktivnost zavisna od koncentracije Na^+ ($[\text{Na}^+]$) van mitohondrija (Kim i Matsouka, 2007). Zbog relativno niskog afiniteta za Ca^{2+} , primarni značaj aktivnosti mtNCX je u odgovoru na brze i velike poraste koncentracije Ca^{2+} u mitohondrijskom matriksu pre nego u finoj regulaciji te koncentracije tokom perioda ćelijskog mirovanja (Palty i sar., 2010). U ovom radu praćena je aktivnost mitohondrijskog $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača u sinaptozomalnim mitohondrijama izolovanim iz hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla. Iako je izlazak Ca^{2+} iz mitohondrija u kontrolnim uslovima bio najveći u NC- 4.62 ± 0.37 nmol Ca^{2+} /mg proteina, zatim u Hip- 3.95 ± 0.18 nmol Ca^{2+} /mg proteina, a najmanji u BS- 2.58 ± 0.28 nmol Ca^{2+} /mg proteina, uzimajući u obzir količinu prethodno akumuliranog Ca^{2+} , našli smo da je iz mitohondrija sva tri regiona izašlo oko 85% Ca^{2+} . Ovaj rezultat ukazuje na podjednaku efikasnost mitohondrijskih $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača u svim ispitivanim regionima.

Pri ispitivanju uticaja estradiola na aktivnost mtNCX, koristili smo E2 u koncentraciji 5×10^{-10} mol/l. Slična koncentracija E2, 2×10^{-10} mol/l, izmerena je u ćelijama jetre i mozga (Borrás i sar., 2005). Takođe detektovani su direktni efekti iste koncentracije E2 na potencijal mitohondrijske membrane, produkciju peroksida i oslobađanje citohroma C u izolovanim mitohondrijama jetre i mozga (sinaptozomalnim i ne-sinaptozomalnim) (Borrás i sar., 2010).

Rezultati naših ispitivanja su pokazali da prisustvo estradiola u koncentraciji 5×10^{-10} mol/l značajano inhibira aktivnost mtNCX u mitohondrijama različitih regiona mozga. Inhibicija je bila najizraženija u mitohondrijama iz Hip, približno 60%, dok je u mitohondrijama iz NC i BS bila podjednaka, oko 40%, u odnosu na kontrolnu aktivnost. Za razliku od naših prethodnih eksperimenata rađenih na sinaptozomalnim mitohondrijama celog mozga, gde je E2 ispoljio inhibitorski efekat na Na^+ -zavisni izlazak Ca^{2+} u prisustvu fiziološke $[\text{Na}^+]$ (20 mmol/l) (Horvat i sar., 2001), u ovom radu na izolovanim sinaptozomalnim mitohondrijama specifičnih moždanih regiona, inhibicija izlaska Ca^{2+} pod delovanjem estradiola je nađena u prisustvu $[\text{Na}^+]$ 100 mmol/l i višim. Zato što mitohondrije *in situ* (unutar ćelije) nikada nisu izložene tako visokim koncentracijama Na^+ , o nađenim efektima estradiola ne možemo govoriti kao o fiziološkim. Ipak, s obzirom da je, kako u već pomenutom našem radu na sinaptozomalnim mitohondrijama celog mozga, tako i u radovima drugih istraživača, nađena modulacija izlaska Ca^{2+} iz mitohondrija pod delovanjem estradiola i u fiziološkim uslovima, smatrali smo da bi na ovom mestu bilo korisno u osnovnim crtama navesti moguće fiziološke posledice inhibicije mitohondrijskih $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača.

Poznato je da se usled inhibicije mtNCX kalcijum zadržava u mitohondrijama i raste koncentracija Ca^{2+} u matriksu ($[\text{Ca}^{2+}]_m$), dakle dolazi do modulacije efikasnosti mitohondrija u puferisanju koncentracije Ca^{2+} u citosolu ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Pi i sar., 2007). S obzirom da je u nervnim ćelijama $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ključan činilac u regulaciji procesa neurotransmisije, ovaj rezultat govori da estradiol modulacijom mitohondrijskog transporta Ca^{2+} ostvaruje indirektan uticaj na tu važnu neuralnu funkciju. S druge strane, porast $[\text{Ca}^{2+}]_m$, bez obzira da li je nastao stimulacijom ulaska ili inhibicijom izlaska Ca^{2+} , dovodi do povećane aktivnosti mitohondrijskih dehidrogenaza osetljivih na Ca^{2+} , kao što je nađeno u mozgu, srcu i drugim tkivima (McCormack i sar., 1990; Garcia i sar., 1996; Giacomello i sar., 2007). Aktivacija pomenutih enzima rezultira stimulacijom mitohondrijske respiracije i procesa izbacivanja protona. Povećan protok protona nadalje stimuliše reverznu aktivnost mitohondrijskog enzima $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPaze}$ (Aprille, 1988; Garcia i sar., 1996) čime E2 učestvuje u regulaciji sinteze ATP-a u mozgu (Shi i sar., 1996; Wang i sar., 2001;). Dakle, možemo zaključiti da delujući na mitohondrije estradiol doprinosi produkciji dodatne energije, s jedne strane potrebne tokom energetski visoko zahtevnog procesa neurotransmisije, a sa druge strane za rad ATP-zavisnih enzima, koji transportuju Ca^{2+}

u druge ćelijske organele (endoplazmatski retikulum). Na taj način estradiol bi učestvovao u očuvanju Ca^{2+} -homeostaze i ukupne aktivnosti nervnih ćelija.

Istraživanja smo nastavili sa ciljem bližeg proučavanja mehanizama delovanja estradiola na mitohondrijski $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivač. Iako je bilo jasno da dobijene rezultate nećemo smeti tumačiti kao stvarna zbivanja u živim ćelijama, odlučili smo da izlazak Ca^{2+} pratimo u prisustvu visoke (nefiziološke) koncentracije Na^+ od 100 mmol/l. Ovu odluku smo doneli na osnovu dva ključna rezultata: prvi je već pomenut inhibicija mitohondrijskog $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivač pod delovanjem estradiola, nađena u prisustvu $[\text{Na}^+] \geq 100$ mmol/l; drugi je da se radi o koncentraciji Na^+ pri kojoj smo detektovali najveću *in vitro* aktivnost mtNCX (Horvat i sar., 2000). Pokazali smo da je u našim eksperimentalnim uslovima estradiol doveo do povećanja afinitet mtNCX za Na^+ u mitohondrijama iz sva tri ispitivana regiona. To je zaključeno na osnovu snižavanja $[\text{Na}^+]$ potrebnih da se postigne polovina maksimalne brzine transporta jona tj. na osnovu pada vrednosti K_m . Istovremeno, E2 je smanjivao maksimalnu brzinu transporta Ca^{2+} (V_{max}), što je bio pokazatelj redukcije kapaciteta mtNCX za Ca^{2+} u prisustvu tog hormona. Paralelan pad vrednosti K_m i V_{max} je svojstven posebnom tipu inhibicije koji se naziva akompetitivna inhibicija, a čija je osnovna karakteristika da se inhibitor (E2) ne vezuje za slobodan transporter (mtNCX) nego samo za transporter koji je prethodno vezao jon(e) koje prenosi (Na^+ i/ili Ca^{2+}).

Pretpostavili smo da jedan od mogućih načina delovanja estradiola ide preko direktnog vezivanja tog hormona za mitohondrije. Da bismo ispitali ovu pretpostavku pratili smo postojanje specifičnih mesta vezivanja E2 za mitohondrije. Nakon određivanja optimalnih uslova za ispitivanje specifičnog vezivanja po moždanim strukturama, koji su bili u skladu sa našim rezultatima na mitohondrijama iz celog mozga (Horvat i sar., 2000), određivane su kinetičke karakteristike vezivanja E2.

Ispitivanjem specifičnog vezivanja u funkciji koncentracije estradiola, utvrdili smo da je ukupna koncentracija vezujućih mesta (B_{max}) izmerena na sinaptosomalnim mitohondrijama sledeća: NC > Hip > BS, dok je afinitet mitohondrija za E2 podjednak u NC i Hip, a najmanji u BS. Vrednosti B_{max} i K_m za sinaptosomalne mitohondrije iz svakog pojedinog regiona (Rezultati 6.2.) odgovaraju onima dobijenim za sinaptosomalne mitohondrije celog mozga (B_{max} od 46 ± 6 fmol/mg i K_m od 0.46 ± 0.07 nmol/l) (Horvat i sar., 2001). Prema našim saznanjima do sada nisu rađena slična ispitivanja na mitohondrijama izolovanim iz drugih

moždanih regiona ili drugih tkiva, pa smo se u analizi ovih rezultata oslonili na njihovo poređenje sa rezultatima ranije dobijenim na sinaptosomalnim plazma membranama (SPM) izolovanim iz istih regiona (Horvat i sar, 1995). Opravdanje ovakvog pristupa našli smo u još uvek nerazrešenoj dilemi molekularnog identiteta mitohondrijskih $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača, glavnih kandidata za mesta vezivanja estradiola detektovanih u ovom radu. Naime, kao što je već rečeno u uvodu, još uvek se ne zna da li su mtNCX zasebna grupa transportera ili su oni identični sa $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivačima prisutnim na ćelijskim plazma membranama. Utvrdili smo da mitohondrije hipokampusa vezuju E2 sa 5 puta većim afinitetom i 4 puta manjim kapacitetom u odnosu na visokoafinitetna vezujuća mesta na SPM istog regiona. Afinitet mitohondrijskih vezujućih mesta je 5 puta veći, a kapacitet 1.5 puta manji u mitohondrijama kaudalnog jedra, dok je afinitet mitohondrija moždanog stabla 4 puta veći, a kapacitet 2 puta manji u odnosu na visokoafinitetna vezujuća mesta na sinaptosomalnim plazma membranama istog moždanog regiona. Još veća razlika je nađena u odnosu na drugu klasu E2-vezujućih mesta detektovanu na SPM, tzv. niskoafinitetna mesta, koja su u odnosu na visokoafinitetna, ispoljavala za jedan red veličine manji afinitet i veći kapacitet za estradiol (Horvat i sar., 1995). Iako rezultati ovog poređenja nisu dovoljni da bi se moglo tvrditi da su E2-vezujuća mesta u mitohondrijama različita od onih na sinaptosomalnim plazma membranama, oni značajno ukazuju na tu mogućnost. Štaviše, razlika u afinitetu i kapacitetu vezivanja estradiola, verovatno odražava razliku u koncentraciji hormona prisutnog u mitohondrijskom i SPM okruženju u fiziološkim uslovima. Možemo pretpostaviti da bi fiziološki značaj višeg afiniteta mitohondrijskih vezujućih mesta za E2 mogo biti u povećanju osetljivosti i mogućnosti metaboličkog odgovora mitohondrija na niže koncentracije tog hormona. Ovom zaključku ide u prilog i uočena korelacija između vezivanja estradiola i njegovog uticaja na aktivnost mtNCX u mitohondrijama izolovanim iz pojedinih regiona. U mitohondrijama hipokampusa koje su ispoljile visok afinitet i kapacitet za estradiol, ujedno je detektovana i najveća inhibicija izlaska Ca^{2+} pod delovanjem estradiola, dok je ta inhibicija bila najmanja u mitohondrijama moždanog stabla, čiji su afinitet i kapacitet za estradiol bili najmanji.

Na osnovu do sada prikazanih rezultata moglo se zaključiti da se efekat estradiola na mitohondrijski transport Ca^{2+} , vidljiv kao inhibicija izlaska Ca^{2+} , ostvaruje vezivanjem hormona za mitohondrije, pa je naš sledeći cilj bio da ispitamo potencijalna mesta vezivanja estradiola. S obzirom da se odgovor mitohondrija na E2 realizuje delovanjem preko specifičnih

E2-vezujućih mesta na proteinskim elementima u sastavu mitohondrijske membrane i/ili preko mitohondrijskih estradiolskih receptora (mtER) (Moss i sar., 1997; Chen i sar., 2004; Psarra i Sekeris, 2009), našu pažnju smo prvenstveno usmerili na ulogu mitohondrijskih $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača i estradiolskih receptora α i β ($\text{ER}\alpha/\beta$).

Shodno literaturnim podacima, koristili smo slobodan estradiol i estradiol vezan sa goveđim serum albuminom (E-BSA) da bismo proverili da li ovaj hormon deluje direktno na nivou mitohondrijske membrane (Razandi i sar., 2000; Segars i Driggers, 2002). Kao što je ranije pomenuto (Uvod 3.2.2.), uzeli smo u obzir činjenicu da E2 zahvaljujući svojim malim molekulima može pasivnom difuzijom da slobodno prolazi kroz membranu mitohondrija, dok je ona nepropusna za velike molekule konjugata E-BSA. Takođe je poznato da vezani BSA ne utiče na strukturalne i fiziološke efekte estradiola (Zheng i sar., 1996). Ranije je detektovano vezivanje oba oblika, E2 i E-BSA, za mitohondrijski membranski enzim F_0F_1 -ATPazu (Kipp i Ramirez, 2001). Takođe je pokazano da slobodni i konjugovani estradiol u istoj meri inhibiraju oslobađanje citohroma C i na taj način smanjuju produkciju ROS i sprečavaju apoptotske promene u mitohondrijama jetre (Borras i sar., 2010). Naši rezultati u vezi sa uticajem na transport Ca^{2+} su pokazali značajnu razliku u potencijalu slobodnog E2 i E-BSA da inhibiraju izlazak Ca^{2+} iz mitohondrija izolovanih iz specifičnih moždanih regiona. Slobodan E2 je ispoljio veći inhibicioni potencijal, smanjujući Na^+ -zavisni izlazak Ca^{2+} iz mitohondrija NC i BS izmeren u kontrolnim uslovima za oko 40%, dok je smanjenje u prisustvu E-BSA u oba regiona bilo manje od 20%. Još veća razlika zapažena je u Hip sa oko 60% inhibicije sa E2 i svega 12% inhibicije u prisustvu E-BSA. Iz ovoga se moglo zaključiti da je ulazak hormona u mitohondrije odgovoran za glavnu njegovog inhibicionog uticaja na izlazak Ca^{2+} . Sa druge strane, s obzirom da E-BSA može delovati samo na membranu (Razandi i sar., 1999; Guo i sar., 2002), dobijeni rezultati ukazuju i na to koji je procenat inhibicije zavisio od dejstva estradiola preko membranskih vezujućih mesta. Međutim, to ne isključuje moguću disocijaciju E2 iz E-BSA i njegov ulazak u mitohondrij. Da bismo potvrdili uočeni membranski efekat i da bismo proverili da li se radi o direktnom delovanju estradiola na mitohondrijski $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivač (kao što su ukazivali rezultati opisani u poglavlju Rezultati 5.2.) eksperimente sa E-BSA smo ponovili i u prisustvu antagoniste $\text{ER}\alpha/\beta$, ICI 182,780. Našli smo da ICI 182,780 u potpunosti eliminiše inhibicioni efekat E-BSA na mitohondrijski izlazak Ca^{2+} u svim ispitivanim regionima. Možemo reći da je ovaj rezultat nedvosmisleno ukazivao na

estradiolske receptore kao posrednike u inhibiciji aktivnosti mitohondrijskih $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača pod delovanjem estradiola.

$\text{ER}\alpha$ i $\text{ER}\beta$ su uobičajeno prisutni u mitohondrijskom matriksu (Chen i sar., 2004; Psarra i Sekeris, 2009) što je išlo u prilog njihovoj ulozi u ostvarivanju efekata E2 nađenih u našim eksperimentima. Da bismo ispitali ovu pretpostavku prvo smo uradili imunoblot analizu mitohondrijskih uzoraka iz sva tri regiona. U svim analiziranim uzorcima pokazano je prisustvo oba tipa receptora. Kolokalizacija $\text{ER}\alpha$ i $\text{ER}\beta$ u subcelularnim frakcijama hipokampusa je opisana i u literaturi (Hart i sar., 2001; Lu i sar., 2004; Milner i sar., 2005), dok je za mitohondrije i endomembrane takođe potvrđena i veća zastupljenost $\text{ER}\beta$ u odnosu na $\text{ER}\alpha$ (Yang i sar., 2004; Milner i sar., 2005). Detekcija $\text{ER}\alpha/\beta$ u našim sinaptosomalnim mitohondrijama izolovanim iz hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla je dodatno ukazala na estradiolske receptore kao moguće posrednike u uočenim efektima estradiola, zato smo korišćenjem specifičnih antagonista i agonista tih receptor nastavili sa ispitivanjem njihove uloge.

Prvo smo pratili uticaj ICI 182,780, $\text{ER}\alpha/\beta$ antagoniste, na modulaciju mitohondrijskog transporta Ca^{2+} pod delovanjem estradiola. Taj agens sprečava vezivanje estradiola za estradiolske receptore i zato se uobičajeno koristi u studijama čiji je cilj da pokažu uključenost $\text{ER}\alpha/\beta$ u ostvarivanju specifičnih odgovora na estradiol (Stirone i sar., 2005; Noel i sar., 2009; Wang i sar., 2009; Giordano i sar., 2010; Gou i sar., 2010.). Naši rezultati su pokazali da ICI 182,780 značajno smanjuje inhibitorni efekat E2 na Na^+ -zavisni izlazak Ca^{2+} iz mitohondrija sva tri regiona. Sprečavanje vezivanja E2 za ER pod delovanjem antagoniste je dovelo do porasta izlaska Ca^{2+} i to ~ 60% u Hip i oko 20% u NC i BS, u odnosu na izlazak izmeren samo sa E2, tj. kada su ER bili dostupni za njegovo vezivanje. Iz ovoga je bilo jasno da u ispitivanim moždanim regionima inhibitorni efekat estradiola na Na^+ -zavisni izlazak Ca^{2+} bar jednim delom zavisi od vezivanja estradiola za $\text{ER}\alpha/\beta$ prisutne u mitohondrijama. Uloga ovih receptora u modulaciji mitohondrijskih funkcija pod delovanjem estradiola (ne-genomskim mehanizmima) je dokumentovana i u literaturi. Delujući preko $\text{ER}\alpha$, estradiol smanjuje produkciju ROS u mitohondrijama endotelih ćelija mozga (Razmara i sar., 2008), dok su oba tipa receptora uključena u E2-modulaciju akumulacije Ca^{2+} u mitohondrijama neurona (Nilsen i Brinton, 2003).

Da bismo ispitili pojedinačne uloge svakog tipa receptora, pratili smo efekte specifičnih agonista estradiolskih receptora na aktivnost mitohondrijskog $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača. Uočena je značajna razlika u uticajima PPT, specifičnog agoniste $\text{ER}\alpha$ i DPN, specifičnog agoniste $\text{ER}\beta$. Našli smo da je DPN, poput estradiola, potentan inhibitor izlaska Ca^{2+} iz mitohondrija, smanjući ga za $\sim 40\%$ u odnosu na kontrolu u mitohondrijama hipokampusa i za $\sim 25\%$ u mitohondrijama kaudalnog jedra i moždanog stabla. Istovremeno PPT jedva da je imao uticaja na izlazak Ca^{2+} ($\sim 10\%$ inhibicije). Dobijeni rezultati su potvrdili da su mitohondrijski estradiolski receptori uključeni u inhibiciju izlaska Ca^{2+} iz sinaptosomalnih mitohondrija i ukazali na to da je uloga $\text{ER}\beta$ u ovom vidu modulacionog delovanja estradiola izraženija od uloge $\text{ER}\alpha$. Pored toga što je, kao što je već rečeno, zastupljenost $\text{ER}\beta$ u mitohondrijama veća od $\text{ER}\alpha$, ovaj zaključak nalazi dodatnu potporu u radovima koji takođe izveštavaju o dominantnom značaju $\text{ER}\beta$ u odgovoru mitohondrija na E2. Estradiol delujući preko $\text{ER}\beta$ smanjuje produkciju ROS u epitelnim ćelijama retine (Giddabassapa i sar., 2010), isti receptor je ključan u stimulaciji glukoznog metabolizma i sistema odbrane od slobodnih radikala u mitohondrijama nervnih ćelija (Brinton, 2008).

Potvrdu o dominantnoj ulozi $\text{ER}\beta$, kao i odgovor na pitanje da li je efekat estradiola na izlazak Ca^{2+} nađen u našim eksperimentima, posledica direktnog delovanja kompleksa estradiola sa estradiolskim receptorima ($\text{E}\cdot\text{ER}$) na mitohondrijski $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivač (mtNCX) dobili smo u nastavku istraživanja. Pratili smo aktivnost mtNCX u prisustvu specifičnog inhibitora tog transportera, CGP 37157, kao i modulatorne efekte E2, PPT i DPN. U našem model sistemu izolovanih sinaptosomalnih mitohondrija, CGP 37157 u koncentraciji 10^{-6} mol/l je gotovo u potpunosti inhibirao aktivnost mtNCX u svim ispitivnim regionima (oko 97% u Hip, 94% u NC i 92% u BS). Istu koncentraciju inhibitora koristili su Kravenskaya i saradnici (2010) u svom radu na mitohondrijama izolovanim iz jetre, dok je sa koncentracijom 0.5×10^{-6} mol/l postignuta polovina maksimalne inhibicije aktivnosti mtNCX na izolovanim mitohondrijama srca (Kravenskaya i sar., 2010; Colegrove i sar., 2000). Iako su niže koncentracije bile efikasne na izolovanim mitohondrijama, u ispitivanjima *in situ* korišćene su nešto više koncentracije CGP 37157, najčešće 5×10^{-6} do 30×10^{-6} mol/l (Gavriel, 1999; Contreras i Satrustegui, 2009). Razlike u koncentracijama primenjenim u eksperimentima na izolovanim mitohondrijama i mitohondrijama *in situ* bi se mogle objasniti nepotpunom apsorpcijom CGP 37157 u ćelije, zbog čega su stvarne koncentracije inhibitora kojima su

izložene mitohondrije unutar ćelija verovatno bile niže od onih kojima su izložene same ćelije. Kada su izolovane mitohondrije bile inkubirane sa E2 pre dodavanja CGP 37157, zapažen je pad inhibitornog potencijala ovog agensa. Kod mitohondrija prethodno tretiranih sa estradiolom, inhibicija aktivnosti mtNCX pod delovanjem CGP 37157 je bila oko 85% za Hip i NC i oko 68% za BS, u odnosu na kontrolu. Sličan efekat je dobijen i preinkubacijom mitohondrija sa DPN pre dodavanje CGP 37157 (inhibicija oko 85% za Hip i NC, oko 75% za BS), dok nije nađen efekat PPT. Prikazani rezultati ukazuju na ulogu ER(β) u modulaciji izlaska Ca^{2+} iz mitohondrija, odnosno da estradiol svoj efekat postiže direktnim delovanjem kompleksa E-ER(β) na mitohondrijski Na^+/Ca^{2+} -izmenjivač. Kojim to mehanizmima estradiol, za koji smo u ovom i ranijim radovima (Horvat i sar., 2000; Horvat i sar., 2001) našli da deluje kao inhibitor izlaska Ca^{2+} iz mitohondrija, istovremeno smanjuje inhibitorni potencijal drugog agensa, ostaje da bude razjašnjeno.

Rezultati izloženi u ovoj doktorskoj tezi nedvosmisleno pokazuju da estradiol negativno reguliše aktivnost mitohondrijskog Na^+/Ca^{2+} -izmenjivač, glavnog mehanizma izlaska Ca^{2+} iz izolovanih sinaptosomalnih mitohondrija hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla ovarijektomisanih ženki pacova, kao i da se mitohondrijski estradiolski receptori javljaju kao posrednici u tom efektu.

VI ZAKLJUČCI

Saglasno postavljenim ciljevima ove doktorske teze i dobijenim rezultatima na mitohondrijama izolovanim iz sinaptozoma hipokampusa (Hip), kaudalnog jedra (NC) i moždanog stabla (BS) možemo da zaključimo sledeće:

1. Analiza našeg mitohondrijskog preparata je pokazala da:

a) suprimacija gonadnih hormona povećava aktivnost mitohondrijskog enzima F_0F_1 -ATPaze, čija se aktivnost ne menja zavisno od faze estrusnog ciklusa.

b) kontaminacija mitohondrijskih preparata, određena na osnovu aktivnosti enzima u prisustvu različitih inhibitora, je manja od 18%.

c) koncentracija estradiola izmerena u serumu ovarijektomisanih (OVX) životinja je niska (3.27×10^{-12} - 5.14×10^{-12} mol/l), čime su izbegnuti eventualni efekti endogenog estradiola.

Dakle, preparati sinaptozomalnih mitohondrija izolovani iz ovarijektomisanih jedinki su podesan materijal za ispitivanje efekata estradiola na mitohondrijske mehanizme za transport Ca^{2+} , koji su bili predmet prikazanih istraživanja.

2. Rezultati eksperimenata u kojima je praćen uticaj estradiola na mehanizme za transport Ca^{2+} kroz mitohondrijsku membranu su pokazali da:

a) u fiziološkim uslovima, prisustvo estradiola u koncentracijama 10^{-12} - 10^{-7} mol/l nije uticalo na količinu Ca^{2+} unesenog u mitohondrije posredstvom rutenijum red-osetljivog uniportera.

b) u uslovima narušavanja potencijala mitohondrijske membrane, estradiol u koncentraciji od 5×10^{-10} mol/l doprinosi njegovom očuvanju i time dovodi do porasta ulaska Ca^{2+} u izolovane sinaptosomalne mitohondrije. Pretretman sa estradiolom je povećao ulazak Ca^{2+} u prisustvu FCCP za faktor 2 u Hip i NC i faktor 3 u BS.

Moglo se zaključiti da estradiol u fiziološkoj koncentraciji nema direktan uticaj na ulazak Ca^{2+} u sinaptosomalne mitohondrije izolovane iz sva tri ispitivana regiona, ali bi mogao imati indirektan uticaj delujući na potencijal mitohondrijske membrane.

c) Estradiol u fiziološkoj koncentraciji od 5×10^{-10} mol/l, u prisustvu 100 mmol/l egzogenog Na^+ , dovodi do smanjenja Na^+ -zavisnog izlaska Ca^{2+} iz sinaptosomalnih mitohondrija izolovanih iz sva tri ispitivana regiona i to: za $58 \pm 3\%$ u Hip, za $41 \pm 5\%$ u NC i za $37 \pm 11\%$ u BS.

Na osnovu ovog rezultata je zaključeno da fiziološka koncentracija estradiola *in vitro*, u uslovima povišene koncentracije Na^+ , dovodi do značajne inhibicije aktivnosti mitohondrijskog $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača.

3. Estradiol se specifično vezuje za sinaptosomalne mitohondrije izolovane iz Hip, NC i BS mozga OVX ženki pacova i to za jednu populaciju vezujućih mesta sa sledećim kinetičkim karakteristikama:

a) u Hip $B_{\text{max}} = 37.6 \pm 2.6$ fmol/mg proteina i $K_m = 0.69 \pm 0.14$ nmol/l.

b) u NC $B_{\text{max}} = 44.9 \pm 5.2$ fmol/mg proteina i $K_m = 0.56 \pm 0.11$ nmol/l.

c) u BS $B_{\text{max}} = 28.5 \pm 4.7$ fmol/mg proteina i $K_m = 0.94 \pm 0.17$ nmol/l.

Estradiol u koncentracijama u kojima se specifično vezuje za mitohondrije ispitivanih regiona mozga dovodi do smanjenja izlaska Ca^{2+} iz mitohondrija.

4. Primenom membranski nepropusnog E-BSA postignuta je inhibicija izlaska Ca^{2+} do 20%, koja je bila u potpunosti eliminisana antagonistom za estradiolske receptore α/β , ICI 182,780,

što je pokazalo da se inhibitorni efekat estradiola na izlazak Ca^{2+} ne ostvaruje direktnim delovanjem na membranu, odnosno mitohondrijski $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivač.

5. Ispitivanjem uloge mitohondrijskih estradiolskih receptora u modulaciji mitohondrijskog transport Ca^{2+} pod delovanjem estradiola, pokazali smo da u svim ispitivanim regionima:

a) agonista $\text{ER}\alpha$, PPT, veoma slabo inhibira izlazak Ca^{2+} iz izolovanih sinaptosomalnih mitohondrija.

b) agonista $\text{ER}\beta$, DPN, značajno inhibira izlazak Ca^{2+} iz izolovanih sinaptosomalnih mitohondrija i u potpunosti oponaša efekat estradiola.

c) u prisustvu specifičnog inhibitora mitohondrijskog $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača, CGP 37157, estradiol i DPN podjednako modulišu aktivnost izmenjivača, dok efekat PPT nije nađen.

Moglo se zaključiti da estradiol svoj efekat na Na^+ -zavisni izlazak Ca^{2+} iz sinaptosomalnih mitohondrija izolovanih iz sva tri regiona ostvaruje delovanjem na $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivač pretežno preko $\text{ER}\beta$, dok je uticaj preko $\text{ER}\alpha$ manje izražen.

Na osnovu izloženih rezultata i prethodnih zaključaka može se izvesti sledeći generalni zaključak:

Estradiol u fiziološkim koncentracijama ne ostvaruje direktan uticaj na ulazak Ca^{2+} preko rutenijum red-osetljivog uniportera u mitohondrije izolovane iz nervnih završetaka (sinaptozoma) hipokampusa, kaudalnog jedra i moždanog stabla ovarijektomisanih ženki pacova, ali bi mogao da ima indirektan uticaj delujući na očuvanje potencijala mitohondrijske membrane. Kada je u pitanju Na^+ -zavisni izlazak Ca^{2+} , u *in vitro* uslovima povišene koncentracije natrijuma, estradiol značajno inhibira aktivnost $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača na sinaptosomalnim mitohondrijama sva tri ispitivana regiona, povećavajući njegov afinitet za Na^+ . Pomenuta inhibicija može biti u vezi sa detektovanim specifičnim vezivanjem estradiola za sinaptosomalne mitohondrije i većim delom se realizuje posredstvom aktivacije mitohondrijskog estradiolskog receptora β .

VII LITERATURA

- Affolter, H., Carafoli, E. (1980): The Ca²⁺-Na⁺ antiporter of heart mitochondria operates electroneutrally. *Biochem Biophys Res Commun* 95, 193-6.
- Alonso, M.T., Villalobos, C., Chamero, P., Alvarez, J., Garcia-Sancho, J. (2006): Calcium microdomains in mitochondria and nucleus. *Cell Calcium* 40, 513-25.
- Aprile, J.R. (1988): Regulation of the mitochondrial adenine nucleotide pool size in liver mechanism and metabolic role. *FASEB J* 2, 2547-56.
- Babcock, D.F., Hille, B. (1998): Mitochondrial oversight of cellular Ca²⁺ signaling. *Curr Opin Neurobiol* 8, 398-404.
- Barnes, C.J., Vadlamudi, R.K., Kumar, R. (2004): Novel estrogen receptor coregulators and signaling molecules in human diseases. *Cell Mol Life Sci* 61, 281-91.
- Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Forte, M.A., Bernardi, P. (2005): Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* 280, 18558-61.
- Behl, C. (2002): Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nat Rev Neurosci* 3, 433-42.
- Behl, C., Manthey, D. (2000): Neuroprotective activities of estrogen: an update. *J Neurocytol* 29, 351-8.
- Benten, W.P., Lieberherr, M., Giese, G., Wunderlich, F. (1998): Estradiol binding to cell surface raises cytosolic free calcium in T cells. *FEBS Lett* 422, 349-53.
- Bernardi, P. (1999): Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79, 1127-55.
- Bernardi, P., Paradisi, V., Pozzan, T., Azzone, G.F. (1984): Pathway for uncoupler-induced calcium efflux in rat liver mitochondria: inhibition by ruthenium red. *Biochemistry* 23, 1645-51.

- Berridge, M.J. (1998): Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21, 13-26.
- Berridge, M.J. (2006): Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium* 40, 405-12.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L. (2003): Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 517-29.
- Blaustein, M.P., Juhaszova, M., Golovina, V.A., Church, P.J., Stanley, E.F. (2002): Na/Ca exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes: functional implications. *Ann N Y Acad Sci* 976, 356-66.
- Bopassa, J.C., Eghbali, M., Toro, L., Stefani, E. (2010): A novel estrogen receptor GPER inhibits mitochondria permeability transition pore opening and protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298, H16-23.
- Borrás, C., Gambini, J., Gomez-Cabrera, M.C., Sastre, J., Pallardo, F.V., Mann, G.E., Vina, J. (2005): 17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade. *Aging Cell* 4, 113-8.
- Borrás, C., Gambini, J., Lopez-Gruoso, R., Pallardo, F.V., Vina, J. (2010): Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1802, 205-11.
- Borrás, C., Sastre, J., Garcia-Sala, D., Lloret, A., Pallardo, F.V., Vina, J. (2003): Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med* 34, 546-52.
- Bourque, M., Dluzen, D.E., Di Paolo, T. (2009): Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. *Front Neuroendocrinol* 30, 142-57.
- Bowling, A.C., Schulz, J.B., Brown, R.H., Jr., Beal, M.F. (1993): Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 61, 2322-5.
- Brand, M.D. (1985): The stoichiometry of the exchange catalysed by the mitochondrial calcium/sodium antiporter. *Biochem J* 229, 161-6.
- Brini, M. (2003): Ca(2+) signalling in mitochondria: mechanism and role in physiology and pathology. *Cell Calcium* 34, 399-405.
- Brinton, R.D. (2005): Investigative models for determining hormone therapy-induced outcomes in brain: evidence in support of a healthy cell bias of estrogen action. *Ann N Y Acad Sci* 1052, 57-74.
- Brinton, R.D. (2008): Estrogen regulation of glucose metabolism and mitochondrial function: therapeutic implications for prevention of Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 1504-11.
- Brown, B.J., Hilfiker, H., DeMarco, S.J., Zacharias, D.A., Greenwood, T.M., Guerini, D., Strehler, E.E. (1996): Primary structure of human plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoform 3. *Biochim Biophys Acta* 1283, 10-3.
- Brustovetsky, N., Brustovetsky, T., Jemmerson, R., Dubinsky, J.M. (2002): Calcium-induced cytochrome c release from CNS mitochondria is associated with the permeability transition and rupture of the outer membrane. *J Neurochem* 80, 207-18.
- Carafoli, E. (1987): Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 56, 395-433.
- Carafoli, E., Rossi, C.S., Lehninger, A.L. (1964): Cation and anion balance during active

- accumulation of Ca^{2+} and Mg^{2+} by isolated mitochondria. *J Biol Chem* 239, 3055-61.
- Carrasco, M.A., Hidalgo, C. (2006): Calcium microdomains and gene expression in neurons and skeletal muscle cells. *Cell Calcium* 40, 575-83.
 - Carroll, J.C., Pike, C.J. (2008): Selective estrogen receptor modulators differentially regulate Alzheimer-like changes in female 3xTg-AD mice. *Endocrinology* 149, 2607-11.
 - Castaldo, P., Cataldi, M., Magi, S., Lariccia, V., Arcangeli, S. and Amoroso, S. (2009): Role of the mitochondrial sodium/calcium exchanger in neuronal physiology and in the pathogenesis of neurological diseases. *Prog Neurobiol* 87, 58-79.
 - Catterall, W.A. (2000): Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 521-55.
 - Cesar Mde, C., Wilson, J.E. (2004): All three isoforms of the voltage-dependent anion channel (VDAC1, VDAC2, and VDAC3) are present in mitochondria from bovine, rabbit, and rat brain. *Arch Biochem Biophys* 422, 191-6.
 - Chaban, V.V., Lakhter, A.J., Micevych, P. (2004): A membrane estrogen receptor mediates intracellular calcium release in astrocytes. *Endocrinology* 145, 3788-95.
 - Chelyshev Iu, A., Cherepnev, G.V., Saitkulov, K.I. (2001): [Apoptosis in the nervous system]. *Ontogenez* 32, 118-29.
 - Chen, J.Q., Delannoy, M., Cooke, C., Yager, J.D. (2004): Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E1011-22.
 - Chiesi, M., Schwaller, R., Eichenberger, K. (1988): Structural dependency of the inhibitory action of benzodiazepines and related compounds on the mitochondrial Na^{+} - Ca^{2+} exchanger. *Biochem Pharmacol* 37, 4399-403.
 - Chowen, J.A., Torres-Aleman, I., Garcia-Segura, L.M. (1992): Trophic effects of estradiol on fetal rat hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology* 56, 895-901.
 - Colegrove, S.L., Albrecht, M.A., Friel, D.D. (2000): Dissection of mitochondrial Ca^{2+} uptake and release fluxes in situ after depolarization-evoked $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevations in sympathetic neurons. *J Gen Physiol* 115, 351-70.
 - Contreras, L., Satrustegui, J. (2009): Calcium signaling in brain mitochondria: interplay of malate aspartate NADH shuttle and calcium uniporter/mitochondrial dehydrogenase pathways. *J Biol Chem* 284, 7091-9.
 - Cotman, C.W., Matthews, D.A. (1971): Synaptic plasma membranes from rat brain synaptosomes: isolation and partial characterization. *Biochim Biophys Acta* 249, 380-94.
 - Couse, J.F., Korach, K.S. (1999): Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20, 358-417.
 - Crompton, M. (1999): The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341 (Pt 2), 233-49.
 - Crompton, M., Costi, A. (1990): A heart mitochondrial Ca^{2+} -dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states. *Biochem J* 266, 33-9.

- Custodio, J.B., Almeida, L.M., Madeira, V.M. (1991): A reliable and rapid procedure to estimate drug partitioning in biomembranes. *Biochem Biophys Res Commun* 176, 1079-85.
- Dash, R.K., Beard, D.A. (2008): Analysis of cardiac mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchanger kinetics with a biophysical model of mitochondrial Ca²⁺ handling suggests a 3:1 stoichiometry. *J Physiol* 586, 3267-85.
- de Boer, W., Notides, A.C. (1981): Dissociation kinetics of the estrogen receptor immobilized by hydroxylapatite. *Biochemistry* 20, 1285-9.
- De Crescenzo, V., ZhuGe, R., Velazquez-Marrero, C., Lifshitz, L.M., Custer, E., Carmicheal, J., Lai, F.A., Tuft, R.A., Fogarty, K.E., Lemos, J.R., Walsh, J.V.Jr. (2004): Ca²⁺ syntillas, miniature Ca²⁺ release events in terminals of hypothalamic neurons, are increased in frequency by depolarization in the absence of Ca²⁺ influx. *J Neurosci* 24, 1226-35.
- De Waard, M., Gurnett, C.A., Campbell, K.P. (1996): Structural and functional diversity of voltage-activated calcium channels. *Ion Channels* 4, 41-87.
- Dewing, P., Boulware, M.I., Sinchak, K., Christensen, A., Mermelstein, P.G., Micevych, P. (2007): Membrane estrogen receptor- α interactions with metabotropic glutamate receptor 1 α modulate female sexual receptivity in rats. *J Neurosci* 27, 9294-300.
- Dominguez-Salazar, E., Shetty, S., Rissman, E.F. (2006): Rapid neural Fos responses to oestradiol in oestrogen receptor α double knockout mice. *J Neuroendocrinol* 18, 195-202.
- DonCarlos, L.L., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L.M. (2009): Neuroprotective actions of selective estrogen receptor modulators. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1, S113-22.
- Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ (1986), Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta* 850:436-448.
- Emptage, N.J., Reid, C.A., Fine, A. (2001): Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca²⁺ entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron* 29, 197-208.
- Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M., Gustafsson, J.A. (1997): Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4258-65.
- Exton, J.H. (1985): Role of calcium and phosphoinositides in the actions of certain hormones and neurotransmitters. *J Clin Invest* 75, 1753-7.
- Fendyur, A., Kaiserman, I., Kasinetz, L., Rahamimoff, R. (2004): The burst of mitochondrial diseases: neurons and calcium. *Isr Med Assoc J* 6, 356-9.
- Finch, C.E. (2005): Developmental origins of aging in brain and blood vessels: an overview. *Neurobiol Aging* 26, 281-91.
- Fiskum, G., Starkov, A., Polster, B.M., Chinopoulos, C. (2003): Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991, 111-9.
- Flanagan-Cato, L.M., Calizo, L.H., Daniels, D. (2001): The synaptic organization of VMH neurons that mediate the effects of estrogen on sexual behavior. *Horm Behav* 40, 178-82.
- Friberg, H., Wieloch, T. (2002): Mitochondrial permeability transition in acute neurodegeneration.

Biochimie 84, 241-50.

- Fugger, H.N., Kumar, A., Lubahn, D.B., Korach, K.S., Foster, T.C. (2001): Examination of estradiol effects on the rapid estradiol mediated increase in hippocampal synaptic transmission in estrogen receptor alpha knockout mice. *Neurosci Lett* 309, 207-9.
- Garcia-Segura, L.M., Azcoitia, I., DonCarlos, L.L. (2001): Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63, 29-60.
- Garcia-Martin, E., Gutierrez-Merino, C. (1996): Rate of Na⁺/Ca²⁺ exchange across the plasma membrane of synaptosomes measured using the fluorescence of chlorotetracycline. Implications to calcium homeostasis in synaptic terminals. *Biochim Biophys Acta* 1280, 257-64.
- Gavriel, D. (1999): Mitochondrial clearance of cytosolic Ca²⁺ in stimulated lizard motor nerve terminals proceeds without progressive elevation of mitochondrial matrix [Ca²⁺]. *J Neurosci* 19, 7495-506.
- Gellerich, F.N., Gizatullina, Z., Nguyen, H.P., Trumbeckaite, S., Vielhaber, S., Seppet, E., Zierz, S., Landwehrmeyer, B., Riess, O., von Horeten, S., Striggow, F. (2008): Impaired regulation of brain mitochondria by extramitochondrial Ca²⁺ in transgenic Huntington disease rats. *J Biol Chem* 283, 30715-24.
- Giacomello, M., Drago, I., Pizzo, P., Pozzan, T. (2007): Mitochondrial Ca²⁺ as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ* 14, 1267-74.
- Giddabasappa, A., Bauler, M., Yepuru, M., Chaum, E., Dalton, J.T., Eswaraka, J. 17-beta estradiol protects ARPE-19 cells from oxidative stress through estrogen receptor-beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 5278-87.
- Gincel, D., Zaid, H., Shoshan-Barmatz, V. (2001): Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J* 358, 147-55.
- Gobbi, P., Castaldo, P., Minelli, A., Salucci, S., Magi, S., Corcione, E., Amoroso, S. (2007): Mitochondrial localization of Na⁺/Ca²⁺ exchangers NCX1-3 in neurons and astrocytes of adult rat brain in situ. *Pharmacol Res* 56, 556-65.
- Gottipati, S., Cammarata, P.R. (2008): Mitochondrial superoxide dismutase activation with 17 beta-estradiol-treated human lens epithelial cells. *Mol Vis* 14, 898-905.
- Gray, G.E., Whittaker, P.V. (1962): The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J Anat* 96:79-88.
- Greeb, J., Shull, G.E. (1989): Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. *J Biol Chem* 264, 18569-76.
- Green, D.R., Kroemer, G. (2004): The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-9.
- Green, P.S., Bishop, J., Simpkins, J.W. (1997): 17 alpha-estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. *J Neurosci* 17, 511-5.
- Green, P.S., Gridley, K.E., Simpkins, J.W. (1998): Nuclear estrogen receptor-independent neuroprotection by estratrienes: a novel interaction with glutathione. *Neuroscience* 84, 7-10.

- Gunter, K.K., Gunter, T.E. (1994): Transport of calcium by mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 26, 471-85.
- Gunter, T.E., Buntinas, L., Sparagna, G., Eliseev, R., Gunter, K. (2000): Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* 28, 285-96.
- Guo, Z., Krucken, J., Benten, W.P., Wunderlich, F. (2002): Estradiol-induced nongenomic calcium signaling regulates genotropic signaling in macrophages. *J Biol Chem* 277, 7044-50.
- Guo, T., Yu, X.L., Ding, Y. (2010): The expression of estrogen receptors in rat genioglossus muscle-derived satellite cells and its relationship to intracellular Ca(2+) mobilization. *Arch Oral Biol* 55, 591-8.
- Haim, S., Shakhar, G., Rossene, E., Taylor, A.N., Ben-Eliyahu, S. (2003): Serum levels of sex hormones and corticosterone throughout 4- and 5-day estrous cycles in Fischer 344 rats and their simulation in ovariectomized females. *J Endocrinol Invest* 26, 1013-22.
- Hajnoczky, G., Robb-Gaspers, L.D., Seitz, M.B., Thomas, A.P. (1995): Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell* 82, 415-24.
- Han, H.J., Lee, Y.H., Park, S.H. (2000): Estradiol-17beta-BSA stimulates Ca(2+) uptake through nongenomic pathways in primary rabbit kidney proximal tubule cells: involvement of cAMP and PKC. *J Cell Physiol* 183, 37-44.
- Han, V.Z., Zhang, Y., Bell, C.C., Hansel, C. (2007): Synaptic plasticity and calcium signaling in Purkinje cells of the central cerebellar lobes of mormyrid fish. *J Neurosci* 27, 13499-512.
- Hart, S.A., Patton, J.D., Woolley, C.S. (2001): Quantitative analysis of ER alpha and GAD colocalization in the hippocampus of the adult female rat. *J Comp Neurol* 440, 144-55.
- Horvat, A., Nikezic, G., Martinovic, J.V. (1995): Estradiol binding to synaptosomal plasma membranes of rat brain regions. *Experientia* 51, 11-5.
- Horvat, A., Nikezic, G., Petrovic, S., Kanazir, D.T. (2001): Binding of estradiol to synaptosomal mitochondria: physiological significance. *Cell Mol Life Sci* 58, 636-44.
- Horvat, A., Petrovic, S., Nedeljkovic, N., Martinovic, J.V., Nikezic, G. (2000): Estradiol affect Na-dependent Ca2+ efflux from synaptosomal mitochondria. *Gen Physiol Biophys* 19, 59-71.
- Huang, X., Lei, Z., El-Mallakh, R.S. (2007): Lithium normalizes elevated intracellular sodium. *Bipolar Disord* 9, 298-300.
- Jeffs, G.J., Meloni, B.P., Bakker, A.J., Knuckey, N.W. (2007): The role of the Na(+)/Ca(2+) exchanger (NCX) in neurons following ischaemia. *J Clin Neurosci* 14, 507-14.
- Jonas, P., Burnashev, N. (1995): Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. *Neuron* 15, 987-90.
- Jouaville, L.S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G.A., Rizzuto, R. (1999): Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13807-12.
- Keeton, T.P., Burk, S.E., Shull, G.E. (1993): Alternative splicing of exons encoding the calmodulin-binding domains and C termini of plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoforms 1, 2, 3, and 4. *J Biol Chem* 268, 2740-8.

- Kelly, M.J., Ronnekleiv, O.K., Ibrahim, N., Lagrange, A.H., Wagner, E.J. (2002): Estrogen modulation of K(+) channel activity in hypothalamic neurons involved in the control of the reproductive axis. *Steroids* 67, 447-56.
- Kim, B., Matsuoka, S. (2007): Mitochondrial Ca²⁺ flux through Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Ann N Y Acad Sci* 1099, 507-11.
- Kim, B., Matsuoka, S. (2008): Cytoplasmic Na⁺-dependent modulation of mitochondrial Ca²⁺ via electrogenic mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchange. *J Physiol* 586, 1683-97.
- Kipp, J.L., Ramirez, V.D. (2001): Effect of estradiol, diethylstilbestrol, and resveratrol on F₀F₁-ATPase activity from mitochondrial preparations of rat heart, liver, and brain. *Endocrine* 15, 165-75.
- Klinge, C.M. (2000): Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65, 227-51.
- Kow, L.M., Devidze, N., Pataky, S., Shibuya, I., Pfaff, D.W. (2006): Acute estradiol application increases inward and decreases outward whole-cell currents of neurons in rat hypothalamic ventromedial nucleus. *Brain Res* 1116, 1-11.
- Kravenskaya, E. V., Kramar, S. B., Fedirko, N. V (2010): Role of carboxylic groups in the control of nonspecific permeability of mitochondrial membranes. *Neurophysio* 42, 10-9.
- Kroemer, G., Reed, J.C. (2000): Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513-9.
- Kumar, A., Foster, T.C. (2002): 17beta-estradiol benzoate decreases the AHP amplitude in CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 88, 621-6.
- LaFerla, F.M. (2002): Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 3, 862-72.
- Lai, J.C.K., Clark, J.B. (1970): Preparation of synaptic and nonsynaptic mitochondria from mammalian brain. *Methods Enzymol* 55,51-9.
- Latourelle, J.C., Dybdahl, M., Destefano, A.L., Myers, R.H., Lash, T.L. (2010): Estrogen-related and other disease diagnoses preceding Parkinson's disease. *Clin Epidemiol* 2, 153-70.
- Lee, S.L., Yu, A.S., Lytton, J. (1994): Tissue-specific expression of Na(+)-Ca²⁺ exchanger isoforms. *J Biol Chem* 269, 14849-52.
- Lemasters, J.J., Holmuhamedov, E. (2006): Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor--thinking outside the box. *Biochim Biophys Acta* 1762, 181-90.
- Leshchenko, M.V., Sergeev, P.V. (1987): [Nature of steroid hormone binding to mitochondria]. *Farmakol Toksikol* 50, 60-3.
- Levin, E.R. (2005): Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 19, 1951-9.
- Li, W., Shariat-Madar, Z., Powers, M., Sun, X., Lane, R.D., Garlid, K.D. (1992): Reconstitution, identification, purification, and immunological characterization of the 110-kDa Na⁺/Ca²⁺ antiporter from beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 267, 17983-9.
- Lin, L., Sharma, V.K., Sheu, S.S. (2007): Mechanisms of reduced mitochondrial Ca²⁺ accumulation in failing hamster heart. *Pflugers Arch* 454, 395-402.

- Linford, N.J., Dorsa, D.M. (2002): 17beta-Estradiol and the phytoestrogen genistein attenuate neuronal apoptosis induced by the endoplasmic reticulum calcium-ATPase inhibitor thapsigargin. *Steroids* 67, 1029-40.
- Lobaton, C.D., Vay, L., Hernandez-Sanmiguel, E., Santodomingo, J., Moreno, A., Montero, M., Alvarez, J. (2005): Modulation of mitochondrial Ca(2+) uptake by estrogen receptor agonists and antagonists. *Br J Pharmacol* 145, 862-71.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-75.
- Lu, Y.P., Zeng, M., Swaab, D.F., Ravid, R., Zhou, J.N. (2004): Colocalization and alteration of estrogen receptor-alpha and -beta in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Hum Pathol* 35, 275-80.
- Luk'ianova, L.D., Eliseev, R.A., Makarenko, T.N., Matiushin, A.I. (1994): [The effect of various steroid hormones on Ca²⁺ transport and oxidative metabolism in isolated mitochondria]. *Biull Eksp Biol Med* 118, 616-8.
- Manning, B.D., Cantley, L.C. (2007): AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-74.
- Marino, M., Ascenzi, P., Acconcia, F. (2006): S-palmitoylation modulates estrogen receptor alpha localization and functions. *Steroids* 71, 298-303.
- Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E. (1978): A modification of the Lowry Procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87,206-10.
- Martinez, F., Meaney, A., Espinosa-Garcia, M.T., Pardo, J.P., Uribe, A., Flores-Herrera, O. (1996): Characterization of the F₀F₁-ATPase and the tightly-bound ATP activities in submitochondrial particles from human term placenta. *Placenta* 17, 245-50.
- Matsuda, T., Takuma, K., Baba, A. (1997): Na(+)-Ca²⁺ exchanger: physiology and pharmacology. *Jpn J Pharmacol* 74, 1-20.
- McCormack, J.G., Denton, R.M. (1993): Mitochondrial Ca²⁺ transport and the role of intramitochondrial Ca²⁺ in the regulation of energy metabolism. *Dev Neurosci* 15, 165-73.
- McCormack, J.G., Halestrap, A.P., Denton, R.M. (1990): Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev* 70, 391-425.
- McEwen, B.S. (2001): Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* 91, 2785-801.
- Micevych, P., Dominguez, R. (2009): Membrane estradiol signaling in the brain. *Front Neuroendocrinol* 30, 315-27.
- Miller, R.J. (1991): The control of neuronal Ca²⁺ homeostasis. *Prog Neurobiol* 37, 255-85.
- Milner, T.A., Ayoola, K., Drake, C.T., Herrick, S.P., Tabori, N.E., McEwen, B.S., Warriar, S., Alves, S.E. (2005): Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol* 491, 81-95.
- Minelli, A., Castaldo, P., Gobbi, P., Salucci, S., Magi, S., Amoroso, S. (2007): Cellular and subcellular localization of Na⁺-Ca²⁺ exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat. *Cell Calcium* 41, 221-34.

- Mironova, G.D., Sirota, T.V., Pronevich, L.A., Trofimenko, N.V., Mironov, G.P., Grigorjev, P.A., Kondrashova, M.N. (1982): Isolation and properties of Ca²⁺-transporting glycoprotein and peptide from beef heart mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 14, 213-25.
- Monteith, G.R., Wanigasekara, Y., Roufogalis, B.D. (1998): The plasma membrane calcium pump, its role and regulation: new complexities and possibilities. *J Pharmacol Toxicol Methods* 40, 183-90.
- Morin, C., Zini, R., Simon, N., Tillement, J.P. (2002): Dehydroepiandrosterone and alpha-estradiol limit the functional alterations of rat brain mitochondria submitted to different experimental stresses. *Neuroscience* 115, 415-24.
- Morissette, M., Al Sweidi, S., Callier, S., Di Paolo, T. (2008): Estrogen and SERM neuroprotection in animal models of Parkinson's disease. *Mol Cell Endocrinol* 290, 60-9.
- Moss, R.L., Gu, Q. (1999): Estrogen: mechanisms for a rapid action in CA1 hippocampal neurons. *Steroids* 64, 14-21.
- Moss, R.L., Gu, Q., Wong, M. (1997): Estrogen: nontranscriptional signaling pathway. *Recent Prog Horm Res* 52, 33-68; discussion 68-9.
- Muller, V., Gruber, G. (2003): ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters. *Cell Mol Life Sci* 60, 474-94.
- Murphy, A.N., Bredesen, D.E., Cortopassi, G., Wang, E., Fiskum, G. (1996): Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9893-8.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., Tsujimoto, Y. (2005): Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434, 652-8.
- Nicholls, D., Akerman, K. (1982): Mitochondrial calcium transport. *Biochim Biophys Acta* 683, 57-88.
- Nicholls, D.G. and Scott, I.D. (1980): The regulation of brain mitochondrial calcium-ion transport. The role of ATP in the discrimination between kinetic and membrane-potential-dependent calcium-ion efflux mechanisms. *Biochem J* 186, 833-9.
- Nicholls, D.G., Vesce, S., Kirk, L., Chalmers, S. (2003): Interactions between mitochondrial bioenergetics and cytoplasmic calcium in cultured cerebellar granule cells. *Cell Calcium* 34, 407-24.
- Nikezic, G., Horvat, A., Nedeljkovic, N., Martinovic, J.V. (1996): 17beta-estradiol in vitro affects Na-dependent and depolarization-induced Ca²⁺ transport in rat brain synaptosomes. *Experientia* 52, 217-20.
- Nilsen, J., Brinton, R.D. (2004): Mitochondria as therapeutic targets of estrogen action in the central nervous system. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3, 297-313.
- Nilsen, J., Diaz Brinton, R. (2003): Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2842-7.
- Nilsen, J., Irwin, R.W., Gallaher, T.K., Brinton, R.D. (2007): Estradiol in vivo regulation of brain mitochondrial proteome. *J Neurosci* 27, 14069-77.
- Nilsson, S., Kela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, A., Pettersson, K., Warner, M., Gustafsson, J. (2001): Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81, 1535-65.

- Noel, S.D., Keen, K.L., Baumann, D.I., Filardo, E.J., Terasawa, E. (2009): Involvement of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) in rapid action of estrogen in primate LHRH neurons. *Mol Endocrinol* 23, 349-59.
- Nunez, L., Valero, R.A., Senovilla, L., Sanz-Blasco, S., Garcia-Sancho, J., Villalobos, C. (2006): Cell proliferation depends on mitochondrial Ca²⁺ uptake: inhibition by salicylate. *J Physiol* 571, 57-73.
- Ozawa, S. (1996): Permeation of calcium through glutamate receptor channels. *Neurosci* 8, 261-9.
- Palty, R., Silverman, W.F., Hershfinkel, M., Caporale, T., Sensi, S.L., Parnis, J., Nolte, C., Fishman, D., Shoshan-Barmatz, V., Herrmann, S., Khananshvil, D. (2010): NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 436-41.
- Panfili, E., Sandri, G., Sottocasa, G.L., Lunazzi, G., Liut, G., Graziosi, G. (1976): Specific inhibition of mitochondrial Ca²⁺ transport by antibodies directed to the Ca²⁺-binding glycoprotein. *Nature* 264, 185-6.
- Panov, A.V., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Burke, J.R., Strittmatter, W.J., Greenamyre, J.T. (2002): Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci* 5, 731-6.
- Papadia, S., Stevenson, P., Hardingham, N.R., Bading, H., Hardingham, G.E. (2005): Nuclear Ca²⁺ and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J Neurosci* 25, 4279-87.
- Pappas, T.C., Gametchu, B., Watson, C.S. (1995): Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J* 9, 404-10.
- Parekh, A.B., Putney, J.W., Jr. (2005): Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85, 757-810.
- Parkash, J., Felty, Q., Roy, D. (2006): Estrogen exerts a spatial and temporal influence on reactive oxygen species generation that precedes calcium uptake in high-capacity mitochondria: implications for rapid nongenomic signaling of cell growth. *Biochemistry* 45, 2872-81.
- Pedram, A., Razandi, M., Levin, E.R. (2006): Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol* 20, 1996-2009.
- Pedram, A., Razandi, M., Wallace, D.C., Levin, E.R. (2006): Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. *Mol Biol Cell* 17, 2125-37.
- Penniall, R. (1966): An improved method of the determination of inorganic phosphate by the isobutanol-benzene extraction procedure. *Analytic Biochem* 14, 87-90.
- Perkinson, M.S., Sihra, T.S., Williams, R.J. (1999): Ca²⁺-permeable AMPA receptors induce phosphorylation of cAMP response element-binding protein through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in neurons. *J Neurosci* 19, 5861-74.
- Philipson, K.D., Nicoll, D.A. (2000): Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu Rev Physiol* 62, 111-33.
- Pi, Y., Goldenthal, M.J., Marin-Garcia, J. (2007): Mitochondrial channelopathies in aging. *J Mol Med* 85, 937-51.
- Psarra, A.M., Sekeris, C.E. (2009): Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. *Biochim Biophys Acta* 1787, 431-6.

- Qiu, J., Bosch, M.A., Tobias, S.C., Grandy, D.K., Scanlan, T.S., Ronnekleiv, O.K., Kelly, M.J. (2003): Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C. *J Neurosci* 23, 9529-40.
- Qiu, J., Bosch, M.A., Tobias, S.C., Krust, A., Graham, S., Murphy, S.J., Korach, K.S., Chambon, P., Scanlan, T.S., Ronnekleiv, O.K. and Kelly, M.J. (2006): A G-protein-coupled estrogen receptor is involved in hypothalamic control of energy homeostasis. *J Neurosci* 26, 5649-55.
- Racay, P., Bezakova, G., Kaplan, P., Lehotsky, J. (1994): Intracellular Ca²⁺ store from rabbit brain: kinetic aspects of Ca(2+)-stimulated ATPase. *Biochem Mol Biol Int* 33, 981-90.
- Ramirez, V.D., Kipp, J.L., Joe, I. (2001): Estradiol, in the CNS, targets several physiologically relevant membrane-associated proteins. *Brain Res Brain Res Rev* 37, 141-52.
- Rao, B.R. (1998): Isolation and characterization of an estrogen binding protein which may integrate the plethora of estrogenic actions in non-reproductive organs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65, 3-41.
- Rau, S.W., Dubal, D.B., Bottner, M., Gerhold, L.M., Wise, P.M. (2003): Estradiol attenuates programmed cell death after stroke-like injury. *J Neurosci* 23, 11420-6.
- Razandi, M., Pedram, A., Greene, G.L., Levin, E.R. (1999): Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 13, 307-19.
- Razandi, M., Pedram, A., Levin, E.R. (2000): Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Mol Endocrinol* 14, 1434-47.
- Razmara, A., Sunday, L., Stirone, C., Wang, X.B., Krause, D.N., Duckles, S.P., Procaccio, V. (2008): Mitochondrial effects of estrogen are mediated by estrogen receptor alpha in brain endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 325, 782-90.
- Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., Prossnitz, E.R. (2005): A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307, 1625-30.
- Rizzuto, R., Pozzan, T. (2006): Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* 86, 369-408.
- Robb-Gaspers, L.D., Rutter, G.A., Burnett, P., Hajnoczky, G., Denton, R.M., Thomas, A.P. (1998): Coupling between cytosolic and mitochondrial calcium oscillations: role in the regulation of hepatic metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1366, 17-32.
- Robertson, C.L., Scafidi, S., McKenna, M.C., Fiskum, G. (2009): Mitochondrial mechanisms of cell death and neuroprotection in pediatric ischemic and traumatic brain injury. *Exp Neurol* 218, 371-80.
- Santos, A.E., Duarte, C.B., Iizuka, M., Barsoumian, E.L., Ham, J., Lopes, M.C., Carvalho, A.P., Carvalho, A.L. (2006): Excitotoxicity mediated by Ca²⁺-permeable GluR4-containing AMPA receptors involves the AP-1 transcription factor. *Cell Death Differ* 13, 652-60.
- Saris, N.E., Carafoli, E. (2005): A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biochemistry (Mosc)* 70, 187-94.
- Sattler, R., Tymianski, M. (2000): Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* 78, 3-13.
- Saunders-Pullman, R., Gordon-Elliott, J., Parides, M., Fahn, S., Saunders, H.R., Bressman, S. (1999): The effect of estrogen replacement on early Parkinson's disease. *Neurology* 52, 1417-21.

- Schellenberg, G.D., Anderson, L., Cragoe, E.J., Jr., Swanson, P.D. (1985): Inhibition of brain mitochondrial Ca²⁺ transport by amiloride analogues. *Cell Calcium* 6, 431-47.
- Schiff, R., Massarweh, S., Shou, J., Osborne, C.K. (2003): Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clin Cancer Res* 9, 447S-54S.
- Schmidt, P.J., Nieman, L.K., Danaceau, M.A., Adams, L.F., Rubinow, D.R. (1998): Differential behavioral effects of gonadal steroids in women with and in those without premenstrual syndrome. *N Engl J Med* 338, 209-16.
- Seeburg, P.H. (1993): The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci* 16, 359-65.
- Segars, J.H., Driggers, P.H. (2002): Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part I: membrane-associated signaling complexes. *Trends Endocrinol Metab* 13, 349-54.
- Sheehan, J.P., Swerdlow, R.H., Miller, S.W., Davis, R.E., Parks, J.K., Parker, W.D., Tuttle, J.B. (1997): Calcium homeostasis and reactive oxygen species production in cells transformed by mitochondria from individuals with sporadic Alzheimer's disease. *J Neurosci* 17, 4612-22.
- Sherwood, L. (2008): The plasma membrane and membrane potential. U: *Human physiology: from cells to system* (Brooks/Cole Ed) str: 78.
- Shughrue, P.J., Askew, G.R., Dellovade, T.L., Merchenthaler, I. (2002): Estrogen-binding sites and their functional capacity in estrogen receptor double knockout mouse brain. *Endocrinology* 143, 1643-50.
- Siesjo, B.K. (1990): Calcium in the brain under physiological and pathological conditions. *Eur Neurol* 30 Suppl 2, 3-9; discussion 39-41.
- Simpkins, J.W., Wang, J., Wang, X., Perez, E., Prokai, L., Dykens, J.A. (2005): Mitochondria play a central role in estrogen-induced neuroprotection. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4, 69-83.
- Simpkins, J.W., Yi, K.D., Yang, S.H. (2009): Role of protein phosphatases and mitochondria in the neuroprotective effects of estrogens. *Front Neuroendocrinol* 30, 93-105.
- Simpson, P.B., Russell, J.T. (1998): Role of mitochondrial Ca²⁺ regulation in neuronal and glial cell signalling. *Brain Res Brain Res Rev* 26, 72-81.
- Singer, C.A., Rogers, K.L., Strickland, T.M., Dorsa, D.M. (1996): Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neurosci Lett* 212, 13-26.
- Singh, M., Dykens, J.A., Simpkins, J.W. (2006): Novel mechanisms for estrogen-induced neuroprotection. *Exp Biol Med (Maywood)* 231, 514-21.
- Soane, L., Kahraman, S., Kristian, T., Fiskum, G. (2007): Mechanisms of impaired mitochondrial energy metabolism in acute and chronic neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res* 85, 3407-15.
- Spat, A., Fulop, L., Koncz, P., Szanda, G. (2009): When is high-Ca⁺ microdomain required for mitochondrial Ca⁺ uptake? *Acta Physiol (Oxf)* 195, 139-47.
- Stirone, C., Boroujerdi, A., Duckles, S.P., Krause, D.N. (2005): Estrogen receptor activation of phosphoinositide-3 kinase, akt, and nitric oxide signaling in cerebral blood vessels: rapid and long-term effects. *Mol Pharmacol* 67, 105-13.

- Struble, R.G., Nathan, B.P., Cady, C., Cheng, X., McAsey, M. (2007): Estradiol regulation of astroglia and apolipoprotein E: an important role in neuronal regeneration. *Exp Gerontol* 42, 54-63.
- Szego, E.M., Barabas, K., Balog, J., Szilagy, N., Korach, K.S., Juhasz, G., Abraham, I.M. (2006): Estrogen induces estrogen receptor alpha-dependent cAMP response element-binding protein phosphorylation via mitogen activated protein kinase pathway in basal forebrain cholinergic neurons in vivo. *J Neurosci* 26, 4104-10.
- Tang, L., Zhang, Y. (2005): Mitochondria are the primary target in isothiocyanate-induced apoptosis in human bladder cancer cells. *Mol Cancer Ther* 4, 1250-59.
- Toran-Allerand, C.D. (2005): Estrogen and the brain: beyond ER-alpha, ER-beta, and 17beta-estradiol. *Ann N Y Acad Sci* 1052, 136-44.
- Tunez, I. Collado, J.A., Medina, F.J., Pena, J., Munoz M, D. C., Jimena, J., Franco, F., Rueda, I., Feijoo, M., Muntane, J., Montilla, P. (2006): 17 beta-Estradiol may affect vulnerability of striatum in a 3-nitropropionic acid-induced experimental model of Huntington's disease in ovariectomized rats. *Neurochem Int* 4, 367-73.
- Turner, C.P., Connell, J., Blackstone, K., Ringler, S.L. (2007): Loss of calcium and increased apoptosis within the same neuron. *Brain Res* 1128, 50-60.
- Valles, S.L., Dolz-Gaiton, P., Gambini, J., Borrás, C., Lloret, A., Pallardo, F.V., Vina, J. (2010): Estradiol or genistein prevent Alzheimer's disease-associated inflammation correlating with an increase PPAR gamma expression in cultured astrocytes. *Brain Res* 1312, 138-44.
- Vasudevan, N., Pfaff, D.W. (2008): Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. *Front Neuroendocrinol* 29, 238-57.
- Verkhatsky, A. (2006): Calcium ions and integration in neural circuits. *Acta Physiol (Oxf)* 187, 357-69.
- Wang, G.J., Thayer, S.A. (1996): Sequestration of glutamate-induced Ca²⁺ loads by mitochondria in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 76, 1611-21.
- Wang, J., Green, P.S., Simpkins, J.W. (2001): Estradiol protects against ATP depletion, mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 77, 804-11.
- Wang, X., Dykens, J.A., Perez, E., Liu, R., Yang, S., Covey, D.F., Simpkins, J.W. (2006): Neuroprotective effects of 17beta-estradiol and nonfeminizing estrogens against H₂O₂ toxicity in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Mol Pharmacol* 70, 395-404.
- Warner, M., Gustafsson, J.A. (2006): Nongenomic effects of estrogen: why all the uncertainty? *Steroids* 71, 91-5.
- Weerth, S.H., Holtzclaw, L.A., Russell, J.T. (2007): Signaling proteins in raft-like microdomains are essential for Ca²⁺ wave propagation in glial cells. *Cell Calcium* 41, 155-67.
- West, A.E., Chen, W. G., Dalva, M. B., Dolmetsch, R.E., Kornhauser, J.M., Shaywitz, A.J., Takasu, M.A., Tao, X., Greenberg, M.E. (2001): Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11024-31.
- Wong, C.W., McNally, C., Nickbarg, E., Komm, B.S., Cheskis, B.J. (2002): Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation

cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14783-8.

- Wu, T.W., Wang, J.M., Chen, S., Brinton, R.D. (2005): 17Beta-estradiol induced Ca²⁺ influx via L-type calcium channels activates the Src/ERK/cyclic-AMP response element binding protein signal pathway and BCL-2 expression in rat hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen-induced neuroprotection. *Neuroscience* 135, 59-72.
- Yang, S.H., Liu, R., Perez, E.J., Wen, Y., Stevens, S.M., Valencia, T., Brun-Zinkernagel, A., Prokai, L., Will, Y., Dykens, J., Koulen, P., Simpkins, J.W.. (2004): Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4130-5.
- Yang, S.H., Sarkar, S.N., Liu, R., Perez, E.J., Wang, X., Wen, Y., Yan, L.J., Simpkins, J.W. (2009): Estrogen receptor beta as a mitochondrial vulnerability factor. *J Biol Chem* 284, 9540-● 8.
- Yu, H.P., Chaudry, I.H. (2009): The role of estrogen and receptor agonists in maintaining organ function after trauma-hemorrhage. *Shock* 31, 227-37.
- Zandi, P.P., Carlson, M.C., Plassman, B.L., Welsh-Bohmer, K.A., Mayer, L.S., Steffens, D.C., Breitner, J.C. (2002): Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study. *JAMA* 288, 2123-9.
- Zazueta, C., Zafra, G., Vera, G., Sanchez, C., Chavez, E. (1998): Advances in the purification of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter using the labeled inhibitor 103Ru360. *J Bioenerg Biomembr* 30, 489-98.
- Zhang, S.J., Steijaert, M.N., Lau, D., Schutz, G., Delucinge-Vivier, C., Descombes, P., Bading, H. (2007): Decoding NMDA receptor signaling: identification of genomic programs specifying neuronal survival and death. *Neuron* 53, 549-62.
- Zheng, J., Ali, A., Ramirez, V.D. (1996): Steroids conjugated to bovine serum albumin as tools to demonstrate specific steroid neuronal membrane binding sites. *J Psychiatry Neurosci* 21, 187-97.
- Zheng, J., Ramirez, V.D. (1999): Rapid inhibition of rat brain mitochondrial proton F0F1-ATPase activity by estrogens: comparison with Na⁺, K⁺ -ATPase of porcine cortex. *Eur J Pharmacol* 368, 95-102.