

# Uloga TLR2 u modulaciji sinaptičke plastičnosti i oporavka poslije ishemijskoga oštećenja mišjega mozga

---

Gorup, Dunja

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:706225>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Dunja Gorup**

**Uloga TLR2 u modulaciji sinaptičke  
plastičnosti i oporavka poslije  
ishemijskoga oštećenja  
mišjega mozga**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2016.**



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Dunja Gorup**

**Uloga TLR2 u modulaciji sinaptičke  
plastičnosti i oporavka poslije  
ishemijskoga oštećenja  
mišjega mozga**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2016.**



Disertacija je izrađena na Sveučilištu u Zagrebu, Medicinskom fakultetu, Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, u Laboratoriju za neurogenetiku i razvojnu genetiku, Zagreb, Hrvatska

i na Sveučilištu Laval, Medicinskom fakultetu, Istraživačkom centru Kliničkog bolničkog centra Sveučilišta Laval, u Laboratoriju Zavoda za psihijatriju i neuroznanost, Quebec City, Kanada.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Srećko Gajović

Suvoditeljica rada: prof. dr. sc. Jasna Krifić

*Zahvaljujem svojim voditeljima,*

*prof. dr. sc. Jasni Križ i prof. dr. sc. Srećku Gajoviću  
na izlasku ususret, potpori i pomoći tijekom izrade ovog doktorata,  
ali i oblikovanju i usmjeravanju mog pristupa znanosti.  
Svojim su primjerom strpljivo i mudro ukazali  
na temeljne odrednice kvalitetnog istraživanja,  
te je sama izrada doktorata u njihovim laboratorijima bila privilegija koja  
poziva da se mladi znanstvenik na njih ugleda i u svom daljnjem radu.*

*Osobito želim zahvaliti doc. Dinku Mitrečiću i prof. Rolandu Pochetu čiji su  
poticaji bili presudni u izradi pokusa i tumačenju rezultata.*

*Hvala kolegici Ladi Brkić Ahmed na motivaciji i lektoriraju radnih verzija  
disertacije te svim suradnicima na njihovoj bezrezervnoj pomoći i  
profesionalnosti.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji na podršci i razumijevanju.*

# SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD I SVRHA RADA .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Istraživanje moždanog udara kao javnozdravstveni prioritet.....	1
1.2.	flivotinjski modeli ishemijskog moždanog udara .....	3
1.2.1.	<i>Osnovne značajke životinjskih modela ishemijskog moždanog udara .....</i>	<i>3</i>
1.2.2.	<i>Komparativna anatomija krvnih žila presudna je za odabir modela ishemije .....</i>	<i>4</i>
1.2.3.	<i>Značajke MCAO modela ishemijskog oštećenja mozga .....</i>	<i>5</i>
1.2.4.	<i>Inačice MCAO modela .....</i>	<i>6</i>
1.2.5.	<i>Čimbenici varijabilnosti MCAO modela .....</i>	<i>7</i>
1.3.	Akutna i odgo ena zbivanja u ishemijskom o-te enju mozga .....	8
1.3.1.	<i>Ekscitotoksičnost posredovana glutamatom dovodi do valova depolarizacije i povećanja unutarstaničnog kalcija .....</i>	<i>9</i>
1.3.2.	<i>Reperfuzija pojačava intenzitet upale i apoptoze neurona .....</i>	<i>10</i>
1.3.3.	<i>Neurotoksična i neuroprotektivna svojstva upalnih čimbenika .....</i>	<i>11</i>
1.3.3.1.	Mikroglija kao središnja točka upale nakon ishemije .....	11
1.3.3.2.	Rezidentne stanice CNS-a u upali nakon ishemijskog oštećenja .....	14
1.3.3.2.1.	Astrociti .....	14
1.3.3.2.2.	Perivaskularni makrofagi .....	15
1.3.3.2.3.	Dendritičke stanice.....	15
1.3.3.3.	Infiltrirajuće stanice u upali nakon ishemijskog oštećenja .....	15
1.3.3.3.1.	Neutrofilii .....	15
1.3.3.3.2.	Makrofagi i limfociti .....	16
1.4.	Upala i receptori nalik na Toll .....	16
1.4.1.	<i>Otkriće i filogenetska konzerviranost .....</i>	<i>17</i>
1.4.2.	<i>Struktura i izražaj .....</i>	<i>17</i>
1.4.3.	<i>Signalni put.....</i>	<i>18</i>
1.5.	Signalni put ovisan o TLR2 u postishemijskoj upali mozga .....	20
1.6.	Prekliničko snimanje laboratorijskih flivotinja .....	23
1.6.1.	<i>Primjena bioluminiscencije u biomedicinskim istraživanjima.....</i>	<i>23</i>
1.6.2.	<i>Oslikavanje bioluminiscencije na modelu ishemijskog oštećenja mišjeg mozga.....</i>	<i>24</i>
1.6.3.	<i>Snimanje izražaja Gap43 u mozgu .....</i>	<i>25</i>
1.6.3.1.	<i>Izražaj gena GAP43 tijekom embrionalnog razvoja i regeneracije neurona .....</i>	<i>25</i>
1.6.4.	<i>Zatočeni oblik luciferina kao biljeg aktivnosti cjepajućih bjelančevina apoptotičkog puta.....</i>	<i>27</i>
<b>2.</b>	<b>HIPOTEZA .....</b>	<b>28</b>
<b>3.</b>	<b>CILJEVI RADA .....</b>	<b>29</b>
3.1.	Op i cilj .....	29
3.2.	Specifi ni ciljevi.....	29
<b>4.</b>	<b>MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>30</b>

4.1.	Usklađenost s etičkim smjernicama i zakonskim propisima .....	30
4.2.	Plan istraživanja s vremenskim točkama .....	30
4.3.	Pokusne životinje.....	33
4.3.1.	Miševi divljeg tipa C57Bl/6NCrl (WT) .....	33
4.3.2.	Miševi s onemogućenim Tlr2 genom (Tlr2 <sup>-/-</sup> ) .....	34
4.3.3.	Transgenična mišja linija Gap43-luc/gfp.....	34
4.3.4.	Linija miševa B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J.....	35
4.3.5.	Linija miševa Tlr2 <sup>-/-</sup> B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J.....	35
4.4.	Kriteriji za isključivanje životinja iz ispitivanja .....	36
4.5.	Genotipizacija miševa.....	36
4.5.1.	Izolacija DNA iz tkiva.....	36
4.5.2.	Lančana reakcija polimerazom (PCR) .....	37
4.6.	Metoda privremene MCAO kod miša kao model ishemijskog oštećenja mozga .....	39
4.6.1.	Osnovne značajke korištenog MCAO modela.....	39
4.6.2.	Inhalacijska anestezija .....	39
4.6.3.	Izbjegavanje čimbenika posredne povezanosti pri MCAO .....	39
4.6.4.	Opis MCAO zahvata .....	40
4.6.5.	Postoperativna njega.....	42
4.6.6.	Lažno operirane životinje kao kontrole .....	43
4.6.7.	Uporaba laserskog doppler sustava za provjeru protoka u MCAO .....	43
4.7.	Testovi ponašanja miševa .....	43
4.7.1.	Uvjeti za provođenje testova ponašanja .....	43
4.7.2.	Procjena neurološkog oštećenja.....	44
4.7.3.	Schallertov cilindar .....	46
4.7.4.	Ubrzavajući rotarod .....	47
4.7.5.	Obostrani podražaj dodirnom (bilateralna taktilna stimulacija) .....	48
4.8.	Histološka analiza tkiva.....	48
4.8.1.	Priprema tkiva za histološke analize .....	48
4.8.1.1.	Izolacija mozga za histološke analize.....	48
4.8.1.2.	Rezanje na kriostatu .....	49
4.8.2.	Bojenje presjeka mišjeg mozga prema Nisslu (krezil violet) .....	49
4.8.3.	Imunohistokemija.....	49
4.8.4.	Kvalitativna analiza uzoraka.....	52
4.9.	Kvantitativna lančana reakcija polimeraze s korakom obrnutog prepisivanja (qRT-PCR) .....	54
4.9.1.	Izolacija RNA.....	54
4.9.2.	Prepisivanje u cDNA .....	55
4.9.3.	Kvantitativna reakcija lančane reakcije polimerazom .....	56
4.10.	Western Blot.....	57
4.10.1.	Izolacija bjelančevina.....	57
4.10.1.1.	Žrtvovanje životinja za izolaciju bjelančevina .....	57
4.10.1.2.	Homogenizacija bjelančevina .....	57



4.10.2.	<i>Elektroforeza bjelančevina u gelu</i> .....	57
4.10.3.	<i>Transfer bjelančevina s gela na membranu</i> .....	58
4.10.4.	<i>Obilježavanje primarnim protutijelima</i> .....	59
4.10.5.	<i>Obilježavanje sekundarnim protutijelima</i> .....	60
4.10.6.	<i>Prikaz signala kemiluminiscijom</i> .....	60
4.11.	<i>In vivo snimanje bioluminiscencije</i> .....	62
4.11.1.	<i>Linija miševa za snimanje bioluminiscencije</i> .....	62
4.11.2.	<i>Supstrat za bioluminiscenciju</i> .....	62
4.11.3.	<i>Protokol bioluminiscencije</i> .....	62
4.11.4.	<i>Analiza signala bioluminiscencije</i> .....	63
4.12.	<i>Statisti ka obrada podataka</i> .....	63
<b>5.</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>65</b>
5.1.	<i>Uspostava i standardizacija mišjeg modela ishemijskog oštećenja</i> .....	65
5.1.1.	<i>Mjerenje protoka na teritoriju MCA potvrđuje privremenu ishemiju mozga</i> .....	65
5.1.2.	<i>Metoda MCAO uzrokuje reproducibilno ishemijsko oštećenje mozga</i> .....	66
5.1.2.1.	<i>Bojanje TTC-om prikazuje prisutnost ishemijskog oštećenja</i> .....	66
5.1.2.2.	<i>Bojanje krezil violetom pokazuje ishemijsko oštećenje standardne veličine</i> .....	67
5.1.3.	<i>Preživljenje nakon MCAO jednako je kod Tlr2<sup>-/-</sup> i miševa divljeg tipa</i> .....	68
5.2.	<i>Testovi ponavljanja miševa kao mjera funkcionalnog oporavka nakon ishemijskog oštećenja</i> .....	69
5.2.1.	<i>Tlr2<sup>-/-</sup> miševi nakon MCAO manje gube na tjelesnoj težini u odnosu na miševe divljeg tipa</i> .....	69
5.2.2.	<i>Neurološko oštećenje nakon MCAO prisutno je kod oba genotipa</i> .....	71
5.2.3.	<i>Spontano kretanje i asimetrična uporaba prednjih udova ukazuju na odgođeni nastup oštećenja kod Tlr2<sup>-/-</sup> u odnosu na miševe divljeg tipa</i> .....	73
5.2.3.1.	<i>Ukupno spontano kretanje u Schallertovom cilindru pokazuje odgođeno oštećenje kod Tlr2<sup>-/-</sup> u odnosu na miševe divljeg tipa</i> .....	73
5.2.4.	<i>Tlr2<sup>-/-</sup> miševi kasnije razvijaju motoričko oštećenje u odnosu na miševe divljeg tipa</i> .....	77
5.2.5.	<i>Poremećaj osjeta dodira ima blaži nastup, a zadržava se dulje kod Tlr2<sup>-/-</sup> u odnosu na miševe divljeg tipa</i> .....	79
5.3.	<i>Sporije sazrijevanje novih krvnih žila i manji broj njihovih grananja kod Tlr2<sup>-/-</sup> u odnosu na miševe divljeg tipa</i> .....	83
5.4.	<i>Izrazitija asimetrija neuralne mreže mjesec dana nakon MCAO kod Tlr2<sup>-/-</sup> u odnosu na miševe divljeg tipa</i> .....	90
5.5.	<i>Izražavanje gena uključenih u signalni put TLR2</i> .....	93
5.5.1.	<i>Sporiji porast izražaja Tlr2 nakon ishemijskog oštećenja kod Tlr2<sup>-/-</sup> u odnosu na miševe divljeg tipa</i> .....	93
5.5.2.	<i>Jači izražaj gena signalnog puta TLR2 nakon ishemijskog oštećenja kod Tlr2<sup>-/-</sup> u odnosu na miševe divljeg tipa</i> .....	95
5.5.3.	<i>Odgovor pojačavanja izražaja gena za Tnf je smanjen kod Tlr2<sup>-/-</sup> u odnosu na miševe divljeg tipa</i> .....	99
5.5.4.	<i>Pojačani izražaj Casp8 kod Tlr2<sup>-/-</sup> u odnosu na miševe divljeg tipa</i> .....	101

5.6.	Povećana prisutnost biljega sinapsi i neuralnog stresa kod Tlr2-/- u odnosu na miševe divljeg tipa .....	103
5.6.1.	<i>Odsutstvo funkcionalnog TLR2 povećava količinu biljega sinapsi DLG4 i sinaptofizina u kroničnoj fazi oporavka od ishemijskog oštećenja u odnosu na miševe divljeg tipa .....</i>	104
5.6.2.	<i>Povećana prisutnost bjelančevine GAP43 u kroničnoj fazi oporavka od ishemijskog oštećenja kod Tlr2-/- u odnosu na miševe divljeg tipa .....</i>	105
5.6.3.	<i>Snažnija i dugotrajnija prisutnost CASP3 nakon ishemijskog oštećenja kod Tlr2-/- u odnosu na miševe divljeg tipa .....</i>	106
5.7.	GAP43 i CASP3 su biljezi neuralnog stresa.....	108
5.7.1.	<i>GAP43 i CASP3 su primarno prisutni u neuronima nakon ishemijskog oštećenja .....</i>	108
5.7.2.	<i>Izražaj Gap43 i Casp3 se značajno povećao nakon ishemijske lezije .....</i>	110
5.7.3.	<i>In vivo praćenje postishemijskog izražaja gena Gap43 na modelu transgeničnih Gap43-luc/gfp miševa.....</i>	115
5.7.4.	<i>GAP43 i CASP3 su značajno kolokalizirani nakon ishemijskog oštećenja .....</i>	116
<b>6.</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>120</b>
6.1.	MCAO je prvi model izbora za istraffivanje molekularnih zbivanja ishemijskog oštećenja mišjeg mozga .....	120
6.2.	Odgođeni nastup senzo-motornih simptoma neurološkog oštećenja kod Tlr2-/- miševa u odnosu na miševe divljeg tipa .....	121
6.3.	TLR2 utječe na nastanak i grananje krvnih žila te ukazuje na povezanost puteva upale i angiogeneze .....	122
6.4.	Asimetrija neuralne mreffe u podlozi neuroloških simptoma.....	123
6.5.	TLR2 dijeli signalni put s drugim receptorima upale .....	123
6.6.	Adapterska bjelančevina MyD 88 nadoknađuje manjak TLR2 .....	124
6.7.	Signalni put TLR2 presudan je za ravnoteffu između upale i apoptoze .....	125
6.8.	Manjak TLR2 dovodi do povećanja CASP8 .....	126
6.9.	Manjak TLR2 povećava izražaj biljega sinapsi i neuralnog stresa .....	126
6.10.	Koordinacija GAP43 i CASP3 u regulaciji oporavka nakon ishemijskog oštećenja .....	127
6.11.	Snimanje bioluminiscencije pomoću prosustrata za luciferazu predstavlja neinvazivno utvrđivanje biomarkera upale i pregradnje .....	128
6.12.	Odrednice za buduća istraffivanja urođene imunosti nakon moždanog udara .....	129
6.12.1.	<i>Nedostaci provedenog znanstvenog istraffivanja .....</i>	129
6.12.2.	<i>Odrednice za buduća istraffivanja .....</i>	130
6.12.3.	<i>Translacijska vrijednost istraffivanja.....</i>	132
<b>7.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>133</b>
7.1.	OPŠTI ZAKLJUČAK.....	133
7.2.	SPECIFIČNI ZAKLJUČCI.....	133
<b>8.</b>	<b>KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU.....</b>	<b>134</b>
<b>9.</b>	<b>KRATKI SADRŽAJ NA ENGLLESKOM JEZIKU - SUMMARY.....</b>	<b>135</b>

10.	POPIS LITERATURE .....	136
11.	ŽIVOTOPIS.....	144

## POPIS OZNAKA I KRATICA

<b>Kratika</b>	<b>Engleski</b>	<b>Hrvatski</b>
ACA	<i>anterior cerebral artery</i>	prednja mofdana arterija
AcGFP	<i>Aequorea coerulea green fluorescent protein</i>	zeleni fluorescentni protein iz akvoreje
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>	-amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol-4-propionska kiselina
APCs	<i>antigen presenting cells</i>	stanice koje predaju antigen
Arc	<i>activity regulated cytoskeletal-associated protein</i>	citoskeletna bjelana evina regulirana aktivno – u
ATF-3	<i>activation transcription factor</i>	imbenik aktivacije transkripcije
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>	adenozin trifosfat
BBB	<i>blood brain barrier</i>	krvnomofdana barijera
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>	neurotropni imbenik iz mozga
CAD	<i>caspase-activated DNase</i>	kaspazom aktivirana DNA-za
CASP3	<i>caspase-3</i>	kaspaza-3
CCA	<i>common carotid artery</i>	zajedni ka karotidna arterija
CCD	<i>charge coupled device</i>	nabojem spergnuti sklop
CFC	<i>contextual fear conditioning</i>	kontekstualno kondicioniranje straha
CNS	<i>central nervous system</i>	sredi-nji fliv ani sustav
DALY	<i>disability adjusted life years</i>	godine flivota s onesposobljeno – u
DAMP	<i>danger/damage associated molecular patterns</i>	molekularni uzorci povezani s o-te enjem
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	deoksiribonukleinska kiselina
ECA	<i>external carotid artery</i>	vanjska karotidna arterija
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>	bjelana evina s domenom za usmr ivanje povezana s Fas-om
Fluc	<i>firefly luciferase</i>	luciferaza krijesnice
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i>	gama-amino-masla na kiselina
GAP43	<i>growth-associated protein-43</i>	bjelana evina povezana s rastom
GDNF	<i>glia derived neurotrophic factor</i>	neurotrofni imbenik porijeklom iz stanica glije
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>	glijalna fibrilarna kiselina bjelana evina
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	zeleni fluorescentni protein
HSPs	<i>heat shock proteins</i>	bjelana evina toplinskog –oka
ICA	<i>internal carotid artery</i>	unutarnja karotidna arterija
ICAD	<i>inhibitor of caspase-activated DNase</i>	inhibitor kaspazom aktivirane DNA-ze
IGF-1	<i>insulin-like growth factor-1</i>	imbenik rasta nalik inzulinu -1
IKK	<i>IκB kinase complex</i>	kompleks kinaze I B
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>	inducibilnu sintetazu du-i nog monoksida
IP (CI)	<i>confidence interval</i>	interval pouzdanosti
IRAK	<i>interleukin-1 receptor associated kinase</i>	kinaza povezana s receptorom za interleukin-1

IRAK4	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase 4</i>	kinaza-4 povezanu s receptorom za interleukin-1
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>	regulatorni imbenik interferona
JNK-AP-1	<i>Janus kinase activating protein-1</i>	aktiviraju e bjelan evine Janus kinaza-1
LPA	<i>lysophosphatidic acid</i>	lizofosfatidi na kiselina
LPS	<i>lipopolysaccharide</i>	lipopolisaharid
LRR	<i>leucine-rich repeats</i>	leucinom bogata ponavljanja
LTA	<i>liptheicoic acid</i>	lioteikoi na kiselina
LTP	<i>long-term potentiation</i>	dugoro na potencijacija
MAL/TIRAP	<i>MyD88-adaptor-like/TIR-associated proteins</i>	bjelan evine nalik na MyD88 adaptor povezane s TIR-om
MBP	<i>myelin basic protein</i>	bazi na mijelinska bjelan evina
MSH	<i>melanocyte stimulating hormone</i>	hormon stimulacije melanocita
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>	mijeloidni imbenik diferencijacije
NeuN	<i>neuronal nuclei</i>	jezgre neurona
NF- B	<i>nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>	nuklearni imbenik- B
NGF	<i>neuronal growth factor</i>	imbenik rasta neurona
NGF	<i>nerve growth factor</i>	imbenik rasta flivaca
NGFI-A	<i>nerve growth factor induced gene A</i>	gen A induciran neuronskim imbenikom rasta
NMDA	<i>N-metil-D-aspartat</i>	N-metil-D-aspartat
NO	<i>nitric oxide</i>	du-ikov monoksid
PAF	<i>platelet activating factor</i>	imbenik aktivacije trombocita
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>	molekule koje su svojstvene patogenima
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>	fosfatni puffer
PCA	<i>posterior cerebral artery</i>	strafinja mofdana arterija
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	lan ana reakcija polimeraze
pIRES	<i>internal ribosome entry site</i>	unutarnje mjesto ulaza ribosoma
PPA	<i>pterygopalatine artery</i>	arterija pterigopalatina
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>	receptori koji prepoznaju uzorak
qRT-PCR	<i>quantitative reverse transcription PCR</i>	kvantitativna reakcija lan ane rakiije polimerazom s korakom obrnutog prepisivanja
ROI	<i>region of interest</i>	regije interesa
ROS	<i>reactive oxygen species</i>	reaktivni radikali kisika
rt-PA	<i>recombinant tissue plasminogen activator</i>	rekombinantni aktivator tkivnog plazminogena
STA	<i>superior thyroid artery</i>	gornja -titna arterija
STAIR	<i>StrokeTreatment Academic Industry Round Table</i>	Okrugli stol znanstvenika i industrije za lije enje mofdanog udara
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>	prijenosnik signala i aktivator prepisivanja 1
TAB	<i>TAK1-binding protein 2</i>	bjelan evina koja vefe TAK1
TAK1	<i>transforming growth factor beta-activated kinase 1</i>	kinaza aktivirana tranformiraju im imbenikom rasta beta 1
TGF-	<i>transforming growth factor- <math>\beta</math></i>	tranformiraju i imbenik rasta-

TIRAP	<i>TIR adaptor protein</i>	adapterska bjelan evina za TIR
TLR	<i>Toll like teceptor</i>	receptor nalik na Toll
Tlr2-/-	<i>Tlr2 knock out mice</i>	mi-evi s onemogu enim <i>Tlr2</i> genom
tMCAO	<i>transient middle cerebral artery occlusion</i>	privremena okluzija sredi-nje mofdane arterije
TNF-	<i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>	imbenik nekroze tumora-
Tollip	<i>Toll interacting protein</i>	bjelan evina koja me udjeluje s Toll-om
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>	imbenik povezan s receptorom za TNF
TRAIL	<i>tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand</i>	ligand koji inducira apoptozu vezan uz imbenik nekroze tumora
TRAM	<i>Toll-receptor-associated molecule</i>	molekula povezana s Toll receptorom
TRIF	<i>Toll-receptor-associated activator of interferons</i>	aktivator interferona povezan s Toll receptorom
WHO	<i>World Health Organisation</i>	Svjetska zdravstvena organizacija
WT	<i>wild type mice</i>	mi-evi divljeg tipa

## 1. UVOD I SVRHA RADA

Mofldani udar (apoplexia cerebri, apopleksija, CVI, cerebrovaskularni inzult, mofldana kap, -lag, -log) je, prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (*engl. World Health Organization, WHO*) iz 1978. godine, naglo nastao flari-ni (fokalni), ili rje e globalni gubitak mofldanih funkcija s neurolo-kim simptomima koji traju dufle od 24 sata ili unutar 24 sata dovode do smrti, a mogu e ga je objasniti isklju ivo poreme ajem mofldane cirkulacije, odnosno perfuzije (krvnog protoka) (1). Granica od 24 sata dijeli dijagnozu mofldanog udara u razvoju (24-28h) i zavr-enog mofldanog udara (nakon 48h) od tranzitorne ishemijske atake (TIA; kra e od 24h) (2).

Prema mehanizmu nastanka mofldani udar dijeli se na ishemijski mofldani udar (nedostatak protoka krvi; 87% slu ajeva) i intrakranijalne hemoragije (krvarenja; 13%) (3).

Poglavito poradi visoke prevalencije, kako u Hrvatskoj, tako i u svijetu, istraffivanja sekundarne prevencije i potencijalnih novih terapijskih pristupa zaslufluju ve u pozornost akademske zajednice. Ovaj doktorat obja-njava ulogu dijela uro ene imunosti posredovane receptorom nalik na Toll-2 (*engl. Toll Like Receptor 2, TLR2*) u oporavku nakon ishemijskog o-te enja mozga.

### 1.1. Istraživanje moždanog udara kao javnozdravstveni prioritet

Mofldani udar je me u vode im uzrocima smrti u svijetu s mortalitetom od 6,7 milijuna godi-nje, a kao pojedina ni uzrok smrti prethodi mu samo ishemijska bolest srca (7,4 milijuna godi-nje) (4). Primjerice, u SAD-u od mofldanog udara svake 3 minute umre jedna osoba (5), a svaka e -esta osoba tijekom svog flivota pretrpjeti bar jedan mofldani udar (6). Globalni podaci pokazuju kako je 2010. godine incidencija mofldanog udara iznosila 17 milijuna osoba, dok je ukupna prevalencija koja uklju uje i preffivjele s ranije pretrpjeljenim mofldanim udarom iznosila ak 33 milijuna (7).

U Hrvatskoj je, prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo iz 2014. godine, najvi-e osoba umrlo od ishemijske bolesti srca (10.831) i cerebrovaskularnih bolesti

(dijagnostička skupina I60-69 prema 10. Međunarodnoj klasifikaciji bolesti: 7.300), slijede rak bronha i pluća (2.827) te zloćudna novotvorina debelog crijeva (2.094) (8).

Pri tome moždani udar čini veliku većinu unutar dijagnostičke skupine I60-69, u koju spadaju još i subarahnoidno, subduralno i epiduralno krvarenje, okluzije, stenozije i ostali rjeđi poremećaji krvnih žila mozga (3).

Smrtnost od kardiovaskularnih bolesti, pod koje se moždani udar registrira, u Europskoj uniji opada, no kako otkrivano trajanje života raste i produljuje se otkrivano preživljenje osoba s bolestima srca i krvnih žila, raste broj muškaraca i žena koje žive s navedenim bolestima. Naime, smrtnost nakon prvog nastupa moždanog udara iznosi oko 30% unutar prvih mjesec dana, dok kod 30% preživjelih nakon 6 mjeseci postoji trajno teško neurološko oštećenje (9).

Prema podacima iz 2007. godine, cerebrovaskularne bolesti nalazile su se među najčešćim uzrokom bolničkog liječenja u Hrvatskoj s ukupnim brojem od 18.893 hospitalizacija (420/100.000), a među njima je kao najčešća pojedinačna dijagnoza bio moždani udar s 50,3% (10). Prema procjeni WHO-a iz 2003. godine, prosječni troškovi njege po bolesniku 6 mjeseci nakon moždanog udara iznosili su 16.000 EUR na temelju čega je moždani udar zauzeo 2. mjesto na popisu najskupljih bolesti starijih osoba (nakon demencije) te se smatra kako će se ti troškovi unutar 10 godina povećati za 40% (11).

Socioekonomsko i javnozdravstveno opterećenje moždanim udarom razvidno je prikazano prilagodenim godinama života s onesposobljenošću (*engl. Disability adjusted life years*, DALYs), u kojima izračun ulaze izgubljene godine života uslijed prijevremenog umiranja i godine života s onesposobljenošću/disabilitetom. WHO procjenjuje kako Hrvatska godišnje izgubi 989 godina na 100.000 stanovnika, tj. ukupno oko 50.000 godina, dok se na globalnoj razini predviđa kako će teret bolesti porasti s 38 milijuna DALY-a izračunatih 1990. na 61 milijun DALY-a 2020. godine.

Unatoč velikom javnozdravstvenom utjecaju, moždanom se udaru u mnogim zemljama ne pridaje dovoljno značenje (12). Iako se u razvijenim zemljama, kao što su „stare“ članice Europske unije, mortalitet od moždanog udara posljednjih godina stabilizirao na oko 65/100.000 (u Hrvatskoj iznosi 112,3/100.000), zbog povećanja udjela stanovništva starije dobne skupine te daljnjim napretkom zemalja s niskom stopom razvoja, projekcije govore kako će incidencija moždanog udara i ubuduće rasti (13, 14).



Zato se bez uinkovitije strategije prevencije, liječenja i rehabilitacije moždanog udara i trokovi liječenja ove bolesti mogu samo povećati (15). Tako zato neuroepidemiološko stanje, uz prognoze zdravstvenih stručnjaka, zahtijeva ulaganja u nova znanstvena istraživanja, uključujući i ona na baziranoj razini, koja će se svojom translacijskom vrijednošću odraziti na kvalitetu života oboljelih.

## **1.2. Životinjski modeli ishemijskog moždanog udara**

Između moždanog udara svakog pojedinog oboljelog postoji velika varijabilnost u pogledu uzroka, trajanja, lokalizacije, težine ishemijske i pratećih sustavnih oboljenja.

To otežava provođenje kliničkog ispitivanja jer je za isključivanje imbenika posredne povezanosti potrebno okupiti vrlo velik broj ispitanika.

Suprotno tome, eksperimentalni modeli omogućuju potpunu kontrolu varijabli i istraživanje specifičnih znanstvenih pitanja imbenika rizika, patofizioloških procesa te preventivno-terapijskih postupaka prije i nakon oštećenja. Od modela se istovremeno očekuje da što vjernije oponašaju ishemijske procese prisutne kod čovjeka.

### **1.2.1. Osnovne značajke životinjskih modela ishemijskog moždanog udara**

Kako bi se ishemijski procesi prisutni kod čovjeka što stvarnije modelirali, prilikom razvoja, odabira ili prilagodbe određenog modela, potrebno je uzeti u obzir nekoliko značajki:

- I. značenje patofizioloških zbivanja za moždani udar kod čovjeka
- II. reproducibilnost
- III. jednostavnost i minimalna invazivnost
- IV. mogućnost nadziranja i održavanja fizioloških parametara
- V. dostupnost uzoraka za histopatološka, biokemijska i molekularna mjerenja
- VI. uloženi trud i troškovi moraju biti unutar granica razumno izvedivog (16)

Prva točka naglašava kako je presudan odabir životinjske vrste koja bi omogućila ekstrapolaciju rezultata istraživanja na ljude. Prema preporukama Okruglog stola znanstvenika i industrije za liječenje moždanog udara (*engl. Stroke Treatment Academic Industry Round Table, STAIR*) ispitivanje lijekova valja započeti na malim životinjama, a u slučaju pozitivnog rezultata replicirati istraživanje na višim sisavcima, primatima (17).

Ispitivanja na manjim životinjama (glodavcima), imaju i oite prednosti u vidu manjih troškova uzgoja te bolje etičke prihvatljivosti u odnosu na primata. U tom su se svjetlu glodavci, a osobito štakori i miševi kao vrste, pokazali idealni jer svojom anatomijom krvnih žila s običnim Willisovim krugom i fiziologijom nalikuju čovjeku (18).

### 1.2.2. Komparativna anatomija krvnih žila presudna je za odabir modela ishemije

Ontogenetska istraživanja pokazuju kako je razvoj krvnih žila pratio razvoj encefalona kako bi zadovoljio njegove visoke potrebe za kisikom i glukozom te su, unatoč svim promjenama arterijskih grana, teritoriji pojedinih moždanih krvnih žila ostali obični (19). Međutim, ostale životinjske vrste pored glodavaca, poput zeca, škumavca, psa i svinje pokazuju prisutnost uspostave kolateralne cirkulacije. Tako primjerice kod pasa *a.vertebralis* preuzima ulogu *a.carotis internae* te brojnim intra- i ekstrakranijalnim anastomozama štiti encefalon od ishemije (20). Takve se vrste, osobito mongolski škumavac, mogu koristiti u modelima globalne ishemije koji oponašaju oštećenje mozga nastalo zakašnjenom ili slabo djelotvornom kardiorespiratornom resuscitacijom s nastupom hipoperfuzije, no nisu pogodne za modele fokalne ishemije (Tablica 1.) (21).

**Tablica 1.** Pregled životinjskih modela moždane ishemije s istaknutim modelom korištenim prilikom izrade doktorata: reverzibilna okluzija središnje moždane arterije, *a. cerebri mediae* (MCAO).

Globalna ishemija		Žarišna (fokalna) ishemija	
POTPUNA	NEPOTPUNA	UNIFOKALNA	MULTIFOKALNA
<ul style="list-style-type: none"> <li>• dekapitacija</li> <li>• okluzija aorte/v.cave</li> <li>• vanjska poveska ili kompresija</li> <li>• srčani zastoj</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• krvarenje ili hipotenzija</li> <li>• hipoksična ishemija</li> <li>• intrakranijalna hipertenzija i okluzija zajedničke karotide (CCA)</li> <li>• okluzija 2 žila i hipotenzija</li> <li>• okluzija 4 žila</li> <li>• unilaterala okluzija CCA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• konstrikcija endotelinom-1</li> <li>• <b>MCAO:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>→ <b>endovaskularna (reverzibilna)</b></li> <li>→ transkranijalna proksimalna(trajna)</li> <li>→ transkranijalna distalna(trajna)</li> </ul> </li> <li>• spontani moždani udar</li> <li>• embolizacija makrosferama</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• embolizacija krvnim ugruškom</li> <li>• embolizacija mikrosferama</li> <li>• fototromboza</li> </ul>

### 1.2.3. Značajke MCAO modela ishemijskog oštećenja mozga

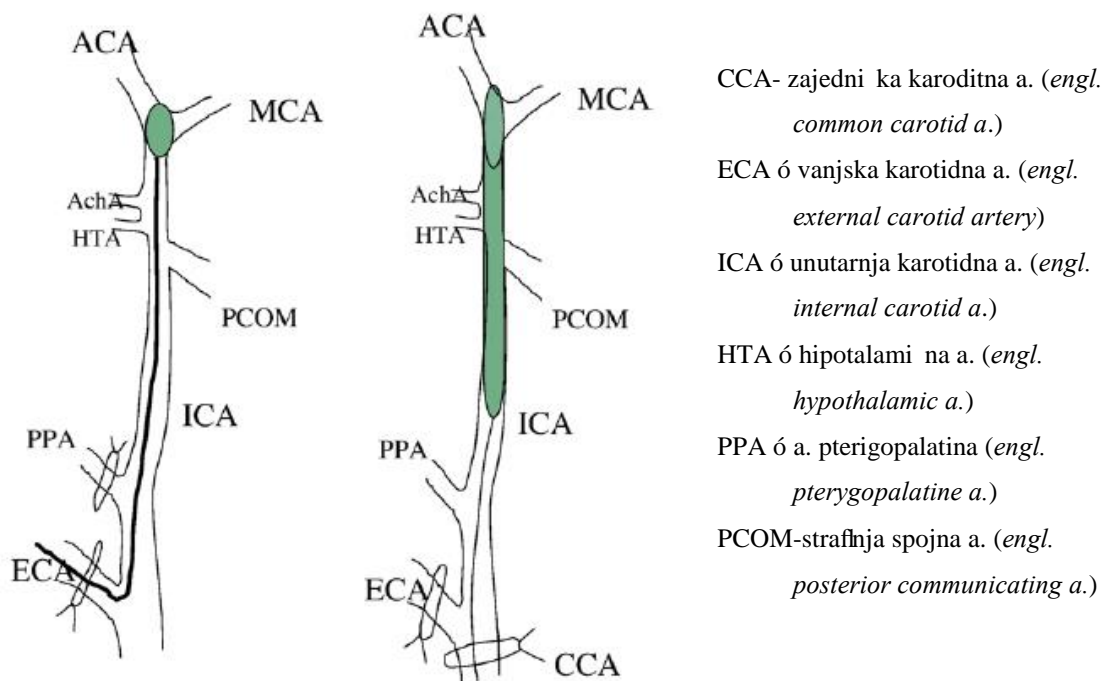
Budući da ishemijski oblik moždanog udara čini oko 80% svih moždanih udara te nastaje uslijed trombotskog ili embolijskog zatvaranja (okluzije) neke od velikih terminalnih krvnih žila mozga, najčešće srednje moždane arterije (*a. cerebri media*), flivotinjski modeli najčešće nastoje reproducirati ishemiju u teritoriju MCA (22).

Načelno, i visoko srodni sojevi miševa poput C57Bl/6, koji su genetska osnova svih miševa korištenih u ovom doktoratu, pokazuju varijacije moždane cirkulacije s visokom učestalošću displazije stražnjih poveznih arterija (*lat. a. communicantes posteriores, engl. posterior communicating a., PcomA*) –to uzrokuje povećanu smrtnost i nestabilnost lezije kod primjene trajne okluzije MCA intraluminalnim filamentom. Navedeno je moguće izbjeći i ukoliko se za okluziju upotrebljava vrlo tanka silikonska presvlaka (veličine 8-0) (23).

Brojna postupna unapređenja postupka ključna su za njegovo poboljšavanje (*engl. refinement*) u pogledu preflivljenja flivotinja, koje čini jedno od 3R dobre laboratorijske prakse rada sa flivotinjama (zamjena, smanjenje, poboljšavanje, *engl. replacement, reduction, refinement, RRR*) (24). To je važno iz razloga –to STAIR preporučuje model trajne MCAO za provođenje početnih ispitivanja lijekova za primjenu u moždanom udaru, osim u slučajevima kad se djelovanje lijeka očekuje nakon reperfuzije (17).

#### 1.2.4. Inačice MCAO modela

Koizumi je 1986. godine prvi opisao izazivanje MCAO intraluminalnim filamentom kod -takora, a od tada je zahvat doffivo brojne preinake. Npr. model je prilago en i za mi-eve, uvedene su nove duljine samog filameta, kao i duljina i materijal kojim je presvu en (Slika 1.) (25, 26). Obzirom na mogu nost ostavljanja trajne okluzije ili uspostave reperfuzije, ustanovljeno je da je vremensko razdoblje 3 sata klju no za ireverzibilna ishemijska o-te enja, dok je za izazivanje reproducibilnih o-te enja koja uklju uju reperfuziju potrebno trajanje okluzije od 60-90 minuta (27). Ina ice trajne okluzije MCA su i elektrokauterizacija njenog proksimalnog (28) i distalnog dijela (29) kroz kraniotomiju.



**Slika 1.** Lijevo je prikazana metoda po Longi gdje se nepresvučeni filament uvodi u unutarnju karotidnu arteriju (engl. Internal Carotid Artery, ICA), a okolne krvne žile ostaju prohodne. Na vrhu filameta je kuglasto zaobljenje kako bi se smanjila mogućnost rupture krvne žile prilikom insrecije. Desno je prikazana Koizumina metoda s intraluminalnim silikonom presvučenim filamentom koji svojom dužinom pored MCA zatvara i AchA, HTA i PCOM. Preuzeto i prilagođeno prema (30).

### 1.2.5. Čimbenici varijabilnosti MCAO modela

Cilj ishemijskog modela je postići i homogenu i reproducibilnu leziju s malom varijabilnošću kako bi se povećala pouzdanost pokusa.

Reperfuzija s proizvoljno varijabilnim vremenom jedna je od prednosti MCAO modela intraluminalnim tj. endovaskularnim filamentom, što preciznije imitira rekanalizaciju koja se zajedno s reperfuzijskom ozljedom najčešće događa kod ljudi (31). Preostale prednosti predstavljaju mala invazivnost (ne zahtjeva kraniotomiju kao primjerice elektrokauterizacija proksimalne ili distalne MCA), mogućnost kontroliranja fizioloških parametara i izazivanje reproducibilnih oštećenja.

Prepoznati izvori varijabilnosti uključuju čimbenike koji ovise o flivotinjama (odabir flivotinja po genotipu, dobi i spolu), vrijeme u danu za provođenje zahvata, variranje fizioloških parametara flivotinje tijekom zahvata te razlike između osoba koje zahvate provode.

Mogući nedostaci same metode uključuju i puknuće krvne žile s posljedičnim subarahnoidalnim krvarenjem. Kako bi se ono svelo na najmanju mjeru komercijalna tvrtka Docol (Sharon, MA, US) sudjeluje sa znanstvenicima u razvoju optimalnog oblika presvučenog filameta. Standardizirali su presvlaku (presvlaka od poli-l-lizina ili silikona), oblik vrha filameta (zaobljen, oštar, koničan), teksturu i konzistenciju (mekana i savitljiva) i time su smanjili učestalost subarahnoidalnog krvarenja i standardnu devijaciju volumena ishemijske lezije (32).

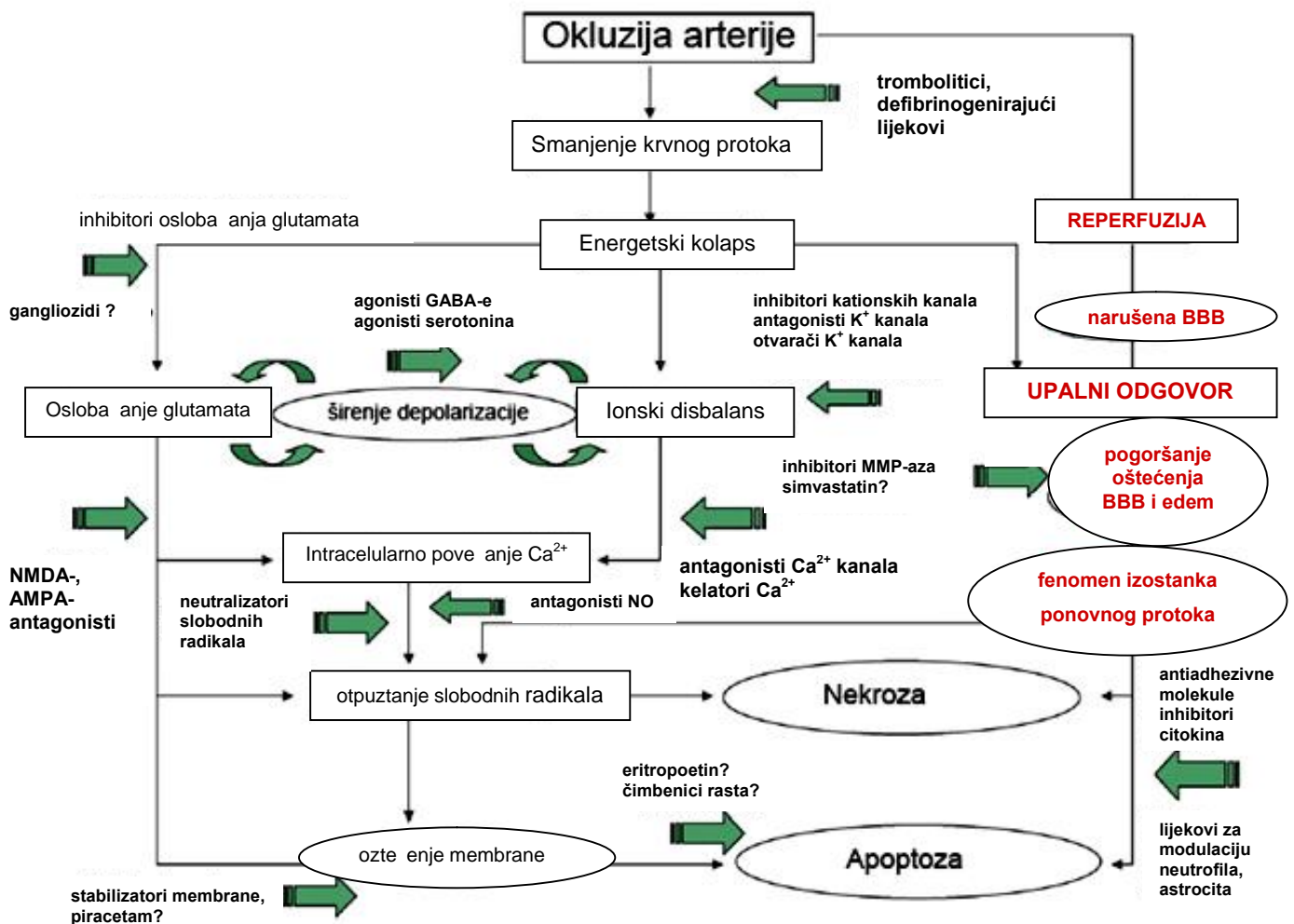
Ostale navedene izvore varijabilnosti svodi se na najmanju moguću mjeru praćenjem protoka pomoću sustava laserskog doplera u teritoriju MCA, praćenjem fizioloških parametara (disanje, tjelesna temperatura, hidracija), osiguravanjem istog operatera koji provodi zahvat te uključivanjem dovoljnog broja lažno operiranih kontrola.

Ne postoji standardni kirurški model koji bi zadovoljavao sve istraffivne potrebe. Naprotiv, obilježja različitih postupaka i varijacija istih doprinose bogatstvu i raznolikosti u bazi nom istraffivanju te potom na razini zajedničkog rezervoara ishoda imitira stvarni problem oboljenja kod ljudi.

### 1.3. Akutna i odgođena zbivanja u ishemijskom oštećenju mozga

Metabolizam mozga se gotovo u potpunosti oslanja na oksidativnu fosforilaciju i pri tome ima relativno visoku potrebu za kisikom i glukozom. Stoga uslijed prekida krvne isporuke potrebnih energenata ubrzo dolazi do nemogućnosti održavanja ionskog gradijenta na membrani stanica, gubi se membranski potencijal te nastupa depolarizacija neurona i glije (33).

Razmjernost okluzije (zatvaranja) krvne žile i njeno trajanje zbirno određuju volumen oštećenja koje se postupno centrifugalno širi iz središta (jezgre) do perifrije i područja rezidualne perfuzije kolateralnom cirkulacijom (polusjena, *lat. penumbra*). Ishemijska kaskada se tako prostorno-vremenski širi i sastoji se od usporednih patogenetskih mehanizama koji obuhvaćaju energetske kolaps, širenje depolarizacije, stvaranje slobodnih radikala, oštećenje barijere krv-mozak (*engl. blood brain barrier, BBB*), upalu i apoptozu (Slika 2.) (30). Stoga nastaje raspodjela stanja oštećenja koji pokazuje spektar aponekroze: od nekroze (odumiranje stanica) u samom ishemijskom središtu, do apoptoze (programirana smrt stanica) na periferiji, u penumbri (34). Optimistično, pokazalo se kako neuroni u tim rubnim područjima teritorija okludirane krvne žile mogu preživjeti satima, pa i danima nakon ishemije (35). Pri tom su privremeno izgubili svoju funkciju, no cijelo područje penumbre zadržava svoj strukturni integritet (30).

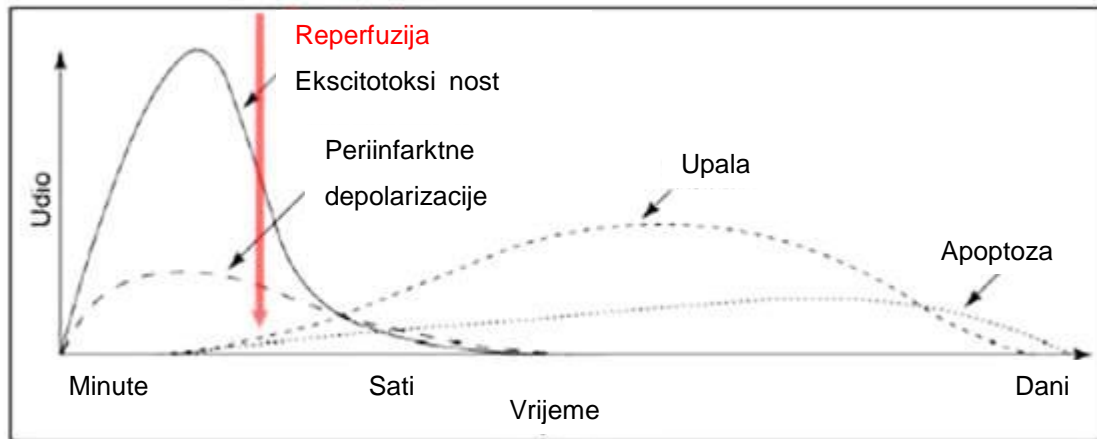


**Slika 2.** Različite sastavnice ishemijske kaskade koje se međusobno isprepliću. NO-dušični monoksid; GABA, gama aminomaslačna kiselina; NMDA, N-metil-D-aspartat; AMPA, alfa-amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol-4-propionska kiselina; MMP-aze, metaloproteinaze matriksa. Prilagođeno i preuzeto iz (30).

### 1.3.1. Ekscitotoksičnost posredovana glutamatom dovodi do valova depolarizacije i povećanja unutarstaničnog kalcija

Po depolarizaciji glije i neurona uslijed energetskog kraha, dolazi do osloba anja ekscitotoksi nih aminokiselina, poglavito glutamata koji ima svojstvo izravne neurotoksi nosti, ali i svojstvo neurotoksi nosti posredne djelovanjem na NMDA-, AMPA- i metabotropne receptore. To dovodi do daljnje neravnoteffe elektrolita (unutarstani no pove anje  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$  i  $Cl^{-}$ ) i edema (Slika 3.) (36). Pove ana razina izvanstani nog kalija i daljnje otpu –tanje glutamata dovode do –irenja depolarizacija koje tro-e dragocjenu energiju glukozom deprivanog tkiva i tako dovode do daljnjeg pove anja volumena nekroze (37, 38). Pored aktiviranih glutamatnih receptora koji su kanali za kalcij, unutarstani ni kalcij raste zahvaljuju i i naponskim kanalima te obrnutim radom natrij-kalcij izmjenjiva a, ali se pri tom i otpu –ta iz unutarstani nih izvora (ER, mitohondriji, sinapti ki mjehuri i) te aktivacijom

protein kinaze C, fosfolipaze A2, fosfolipaze C, ciklooksigenaze, proteaza i endonukleaza dovodi do citotoksi nih produkata (slobodnih radikala i leukotriena) (39).



**Slika 3.** Vremenski prikaz odrednica patofizioloških mehanizama u podlozi ishemijske kaskade. Prednjače mehanizmi ekscitotoksičnosti koji intenzivno oštećuju neurone i gliju dovodeći do nekroze. Sama ekscitotoksičnost predstavlja okidač za periinfarktne depolarizacije, te odgođeni razvoj upale i apoptoze. Apscisa predstavlja vremenski slijed mehanizama, a ordinata razmjerni utjecaj svake od sastavnica na konačni ishod. Preuzeto i prilagođeno iz (36).

### 1.3.2. Reperfuzija pojačava intenzitet upale i apoptoze neurona

Jednom nastali slobodni radikali djeluju nespecifično oksidiraju i bjelancevine i DNA te dovode i do peroksidacije lipida, a k tome služe i kao signalne molekule za okidanje upalne kaskade i apoptoze (36). Paradoksalno, ako u tom razdoblju nastupi reperfuzija koja donosi kisik u novonastali okoliš, do i e do povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih radikala (*engl. reactive oxygen species, ROS*) i pojačavanja upale te posljedice do egzacerbacije neurološkog oštećenja (40). Reperfuzija je ipak jedina odobrena i uinkovita terapija za ishemijski moždani udar. Rekombinantni aktivator tkivnog plazminogena (*engl. recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA*) mora se primijeniti unutar 4,5 sati nakon nastupa ishemijske kako bi se povratio protok. Obzirom na kratki terapijski prozor i visokimbenika rizika, takvo se liječenje može primijeniti u svega 5-10% slučajeva (41).

Stoga postoji potreba za neuroprotektivnim liječenjem koje se ne odnosi na revaskularizaciju, već pristup koji prekida ili usporava četne patofiziološke mehanizme kad rt-PA nije indiciran (42). Rješenje se traži u kombinaciji reperfuzije s neuroprotektivnom terapijom (hipotermija) u kojem bi se povratio normalni gradijent metabolita, a bez daljnjeg amplificiranja upale (43). Tijelo djelomice i samostalno provodi smanjenje reperfuzijskog oštećenja, povećavaju i broj adhezivnih molekula za neutrofile na endotelu krvnih žila zahvaćenog područja te se u njima



radi opstrukcije granulocitima javlja takozvani fenomen izostanka ponovnog protoka (*engl. no reflow phenomenon*) (44).

### **1.3.3. Neurotoksična i neuroprotektivna svojstva upalnih čimbenika**

Intenzitet i trajanje upale, koja dominira u subakutnoj fazi, ovisi o razmjeru akutnih zbivanja ekscitotoksičnosti, depolarizacijama i oksidativnom stresu. Tako se kratki i akutni prekid krvne opskrbe sa slabim oksidativnim i drugim opterećenjem brzo stabilizirati upravo zahvaljujući mehanizmima akutne upale te ne značajno utjecati na dugoročno preživljenje neurona, dok je opsefnija ishemijska lezija dovesti do opetovanih i pojačanih upalnih zbivanja koja mijenjaju svoju prvobitno korisnu funkciju (45).

#### **1.3.3.1. Mikroglija kao središnja točka upale nakon ishemije**

Stanice glije (neuroglija, glija, *grč. γλοία*, hrv. lijepilo) su stanice živčanog sustava čija je funkcija održavanje homeostaze, proizvodnja mijelina te potpora i zaštita samih neurona.

Prvi ih je opisao njemački liječnik i „otac moderne patologije“ Rudolf Ludwig Carl Virchow 1856. kao „*nervenkitt*“ (*njem. nervenkitt*, hrv. lijepilo za živce) nazivaju ih neuroglija (46). U zreлом središnjem živčanom sustavu mogu se podijeliti na astrocite, oligodendrocite, ependimalne stanice i mikrogliju (47).

Tradicionalno stajalište smatralo je gliju pasivnim sudionikom u moždanim funkcijama. Danas se ovo stajalište uvelike promijenilo uslijed napretka tehnologije i akumulacije znanja o gliji. Stoga ove stanice na koje otpada 50 % stanica možda imaju važne uloge aktivno oblikuju i moduliraju i neurone (48).

Stanice mikroglije, koje čine 20% svih glija stanica, prvi je opisao Franz Nissl (*njem. Stabchenzellen*, hrv. –tapiaste stanice) 1880. godine, no „očem mikroglije“ smatra se Pío del Río Hortega (učenik Santiaga Ramón y Cajala), koji ih je promatrao nakon oštećenja tkiva mozga te povezo sa značajkama makrofaga (49, 50).

**Tablica 2.** Primjeri skupina liganada koji se vežu na stanice mikroglije i određuju njeno aktivacijsko stanje. Preuzeto i prilagođeno iz (51).

LIGANDI MIKROGLIJE	PRIMJERI
<b>Površinske strukture i DNA/RNA virusnog, bakterijskog ili gljivičnog podrijetla</b>	agonisti receptora koji prepoznaju uzorak ( <i>engl. pattern recognition receptors</i> , PRR), među kojima su najvažniji receptori TLR1,-2,-3,-4,-6,-9: bakterijski LPS, proteoglikani staničnog zida i lipoteikoi na kiselinu ( <i>engl. lipoteichoic acid</i> , LTA), podjedinice ovojnice retrovirusa gp41 i gp120
<b>Abnormalne endogene bjelančevine</b>	agregati beta amiloida, A <sub>25-35</sub> , A <sub>40</sub> , A <sub>42</sub> , prionski proteini
<b>Komplement</b>	sastavnice sustava komplementa C1q, C5
<b>Protutijela</b>	imunoglobulini raznih razreda i izotipova (IgG, IgA, IgM) predstavljenih u obliku imunoloških kompleksa
<b>Citokini</b>	imbenici stimulacije kolonija i citokini: M-CSF, GM-CSF, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- $\gamma$ , imbenik nekroze tumora- ( <i>engl. tumor necrosis factor alpha</i> , TNF- $\alpha$ ), transformiraju i imbenik rasta- ( <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i> , TGF- $\beta$ ) itd.
<b>Kemokini</b>	ligandi koji se vežu na kemokinske receptore: CCR3, CCR5, CXCR, CXCR2, CXCR4, CX3CR1, IL-8R
<b>Neurotrofni čimbenici</b>	neurotrofni imbenik porijeklom iz mozga ( <i>engl. brain derived neurotrophic factor</i> , BDNF), neurotrofni imbenik porijeklom iz stanica glije ( <i>engl. glia derived neurotrophic factor</i> , GDNF), imbenik rasta živca ( <i>engl. nerve growth factor</i> , NGF), neurotrofini NT-3 i NT-4
<b>Sastavnice krvne plazme</b>	albumin, fibronektin, fibrinogen, trombin
<b>Ostale bjelančevine i peptidi</b>	apolipoprotein E (ApoE), proteini toplinskog šoka HSP60, HSP70, CD40L, hormon stimulacije melanocita ( <i>engl. melanocyte stimulating hormone</i> , MSH), endotelin, S100 proteini, vazoaktivni intestinalni peptid (VIP)
<b>Spojevi povezani s prijenosom podražaja živčanim stanicama</b>	ATP i srodni purini, $\alpha$ -adrenergični agonisti, glutamat, kainat, NMDA
<b>Ioni</b>	ioni kalija i mangana (K <sup>+</sup> , Mn <sup>2+</sup> )
<b>Ostali spojevi</b>	kanabinoidi, ceramidi, gangliozidi, lisofosfatidi na kiselinu ( <i>engl. lysophosphatidic acid</i> , LPA), melanin, endogeni opijati (endomorfini), imbenik aktivacije trombocita ( <i>engl. platelet activating factor</i> , PAF), prostaglandin E <sub>2</sub> , steroidni hormoni

Dok makroglija potječe iz neuralne cijevi (ektoderm), podrijetlo mikroglije su hematopoetske matične stanice iz flumane vreće (ekstraembrionalni mezoderm) koje po diferenciji u primitivne makrofage koloniziraju neuroepitel (52). Primitivni makrofagi ulaze u osnovu za mozak s 9,5 tjedana embrionalnog razvoja (E9,5), prije nego što se krvno-moždana barijera krene stvarati kod E13,5 (53).

Iako se može smatrati kako su sve stanice zatečene u području ishemije jednakomjerno sudionici upale, uključujući i novopristigle neutrofile i makrofage iz krvi, stanice mikroglije su zajednički konvergencijski točka za podražaje nastale u akutnom razdoblju, one se prve aktiviraju te stvojem raznovrsnim u incima igraju glavnu ulogu u odgođenim zbivanjima nakon ishemijske lezije (45). Njihova aktivacija nije još u potpunosti razjašnjena, no smatra se kako raspad neurona zajedno s reaktivnim kisikovim radikalima dovodi do aktivacije inaktivne i mirujuće razgranate mikroglije (54). Izraz „uspavana“ mikroglija nije u potpunosti opravdan, jer i u tom stanju mikroglija ima nadzornu ulogu stalno se pregrađujući u pretrazi vlastitog teritorija. O pretvaranju u aktivan ameboidni fenotip odlučuje prevaga niza vanjskih imbenika kao što su bakterijski lipopolisaharid, LPS, podjedinice ovojnice retrovirusa gp41 i gp120, ali i unutarnjih imbenika kao što su agregati beta amiloida, ATP, ioni kalija, citokini (Tablica 2.) (51).

Već 2 sata nakon smrti prvih neurona, na mjestu ishemije nalazimo mikrogliju pretvorenu u rezidentne makrofage (55). Dok su neuroni izrazito osjetljivi na hipoksiju, mikroglija je pak i u srcu ishemijskog oštećenja nadživjeti i neurone i astrocite, sve dok ishemija ne traje duže od 90 minuta (55, 56). I mikroglija iz okolnih područja bit će privučena signalom oštećenih neurona te ih u bliskom kontaktu (*engl. capping*, hrv. poklapanje) obilježiti za buduću fagocitozu (57).

U aktivnom stanju, pored fagocitoze, mikroglija proizvodi upalne i citotoksične medijatore te tako pojačava oštećenje stanica i staničnu smrt. Primjerice, proizvodi citokine, male signalne molekule koje reguliraju stanični rast, proliferaciju i diferencijaciju (58).

U zdravom su moždanom tkivu citokini konstitutivno prisutni u malim, teško detektabilnim razinama, no nakon nastupa oštećenja, dolazi do brzog i intenzivnog pojačanja njihovog izražaja (26). U skupini proinflammatoryh citokina navode se IL-1, TNF-alfa i IL-6, dok su protuupalni imbenici transformirajućeg imbenika rasta (*engl. Transforming growth factor- $\beta$* , TGF- $\beta$ ) i IL-10 (59).

Proizvodnja TGF- $\beta$  i IL-10 govori u prilog hipotezi da bi aktivacija mikroglije mogla biti i neuroprotektivna (60). Primjerice, stanice mikroglije fagocitiraju neutrofile u oštećenom tkivu te tako sprječavaju daljnje oslobađanje toksičnih medijatora (61). Osim neutrofila i rezidentni makrofagi, u koje se glija pretvorila, uklanjaju nekrotično tkivo i čestice sastavnice debrisa.

K tome, stanice mikroglije proizvode neurotropne imbenike koji stimuliraju neurogenezu i plastičnost (58).

Takav razvoj događaja ukazuje da je rana aktivacija glijalnih stanica štetna za okolno tkivo, dok je kasnija korisna u pogledu uspostave zdrave stanične okoline (45).

Prethodna istraživanja naših suradnika na transgeni miševima kod kojih je selektivnom ablacijom Mac-2 (galektin-3) pozitivnih stanica inhibirana proliferacija mikroglije pokazuju povećani volumen infarciranog tkiva za 13% nakon ishemije od 60 minuta s reperfuzijom, što ipak govori u prilog neuroprotektivnom djelovanju proliferirajuće mikroglije nakon ishemije (62).

Stoga je zaključak kako bi potencijalna idealna terapija tek modulirala odgovor mikroglije s ciljem poticanja neurogeneze (58).

### **1.3.3.2 Rezidentne stanice CNS-a u upali nakon ishemijskog oštećenja**

Pored glavnog efektor upale, stanica mikroglije, u razvoju upale sudjeluju i makroglija (astrociti, oligodendrociti), perivaskularni makrofagi, dendritičke stanice i mastociti, a od infiltrirajućih stanica pridolih iz krvi valja spomenuti neutrofile, monocite i limfocite.

#### **1.3.3.2.1. Astrociti**

U zdravom mozgu astrociti čine najveći udio populacije glijalnih stanica (80%), ali i svih stanica u mozgu općenito (50%) te se svojim oblikom razlikuju ovisno o dijelu mozga u kojem se nalaze (63). Tako u sivoj tvari nalazimo protoplazmatske astrocite s brojnim radijarnim staničnim nastavcima koji svojim nivoima s jedne strane komuniciraju s neuronima, a s druge oblaftu krvne žile i čine sastavnicu krvno-moždane barijere (64). Fibrilarni astrociti, prisutni u bijeloj tvari, nisu u tako bliskom kontaktu s tijelima neurona te nemaju izraženu ulogu tijekom ishemijskog oštećenja (65).

Astrociti pružaju strukturnu, trofičku i metaboličku potporu neuronima te moduliraju sinaptičku plastičnost, što je uvjetovano neposrednim kontaktom dvaju navedenih tipova stanica (66).

Otpornost astrocita na ishemiju u moždanom tkivu tek malo premašuje onu neurona, poglavito iz razloga što su manje osjetljivi na hipoksiju te mogu anaerobno iskorištavati glukozu proizvodeći laktat (67). Njihov je značaj, neposredno nakon nastupa ishemije, dokazan u ublažavanju ekscitotoksičnosti glutamata aktivnim preuzimanjem glutamata  $\text{Na}^+$  ovisnim transporterima (68).

U akutnom razdoblju od nekoliko sati od oštećenja bilo kakvog uzroka dolazi do hipertrofije i proliferacije astrocita koje se naziva reaktivna astroglia (69), s povećanjem izražaja njihovih strukturnih bjelaničevina (GFAP, vimentin) te enzima poput dismutaze, glutation-

peroksidaze i metalotioneina –to povećava kapacitet astrocita za neutralizaciju ROS-ova (70, 71). Pored toga, poticanjem izražavanja hem-oksigenaze uklanjaju željezo iz hema –ime tako –erumanjuju oksidativni stres u slučaju hemoragijskog moždanog udara ili konverzije ishemijskog u hemoragijski moždani udar (66).

U razdoblju od nekoliko sati do nekoliko dana, s najvećim intenzitetom tijekom 48-72 h, astrociti izražavaju inducibilnu sintetazu dušičnog monoksida (*engl. inducible nitric oxide synthase*, iNOS) –to može doprinijeti odgovoru neurona nakon ishemijskog oštećenja (72). Od upalnih citokina, astrociti proizvode TNF- $\alpha$ , IL-1, -6, -10 i IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$  (73, 74). Istovremeno u odgovoru na ishemijsko oštećenje astrociti proliferiraju, migriraju do ruba ishemijske lezije i sudjeluju u stvaranju glijalnog ožiljka (75). Glijalni ožiljak, kao i svaka barijera, ima dvojaku ulogu: –štiti neovršeno tkivo, sprječava –irenje upale i neizravno doprinosi kontroli sastava izvanstaničnog okoliša (76), dok je istovremeno fizička prepreka izrastanju neurita prema mjestu ishemijske lezije (77).

Uslijed ispreplitanja djelovanja raznih –imbenika, kao –to je primjerice izlučivanje citokina iz raznih tipova stanica, preostaje tek ustanoviti točan doprinos astrocita upali.

#### 1.3.3.2.2. Perivaskularni makrofagi

Citokine izlučuju i perivaskularni makrofagi te se smatra kako upravo oni svojom lokacijom utječu na izražavanje adhezivnih molekula na krvnim žilama i posljedično infiltraciju upalnim stanicama (78).

#### 1.3.3.2.3. Dendritičke stanice

Dendritičke stanice su dio imunološkog sustava sisavaca –ija je uloga predodavanje antigena (*engl. antigen presenting cells*, APCs) na vlastitoj površini T-limfocitima te se smatraju glasnici između i stanične imunosti.

Ne nalazimo ih u zdravom moždanom tkivu, već u meningama, koroidnom spletu i likvoru. No, nakon podražaja ishemijskom one se počinju nagomilavati na periferiji (od rezidentnih dendritičkih stanica), ali kasnije i u samom središnjem oštećenju (novopridošle dendritičke stanice) (79).

### 1.3.3.3. *Infiltrirajuće stanice u upali nakon ishemijskog oštećenja*

#### 1.3.3.3.1. Neutrofili

Neutrofilni granulociti najbrojniji su tip leukocita (40%), proizvode se u koštanoj srži od matičnih stanica i otpuštaju u krv odakle privlače adhezivnim molekulama i citokinima

prilasku uz endotel krvnih žila zahvaćenih upalnim zbivanjima te prolaze kroz stijenku krvnih žila (ekstravazacija). Uloga im je izlučivanje upalnih medijatora i fagocitoza.

Uslijed velikog izlaska E-selektina, koji je adhezijska molekula za neutrofile, u malim krvnim žilama može nastupiti tzv. sindrom izostanka ponovnog protoka (*engl. no reflow phenomenon*) zbog zaobljenja nagomilanih stanica koje se još nisu uspjele probiti u tkivo (80).

Infiltracija neutrofilima započinje već unutar pola sata nakon ishemije, a doseže vrhunac unutar nekoliko sati nakon čega ih zamjenjuje dominacija monocita/makrofaga (81, 82).

Svojom degranulacijom akutno otpuštaju iNOS, NADPH oksidazu, mijeloperoksidazu, te enzimi matriks-metaloproteinaze koji pojačavaju upalu.

U odgođenim zbivanjima izlasku velike količine slobodnih kisikovih radikala, proupalnih citokina (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), kemokina (MCP-1, MIP-1, IL-8), elastaze, matriks-metaloproteinaze (uglavnom MMP-9), no njihov utjecaj na veličinu ishemijske lezije nije dokazan (83).

#### 1.3.3.3.2. Makrofagi i limfociti

Upalni signal privlači i monocite iz krvi koji se unutar 10-12 sati nakon ishemijske lezije pridružuju mikroglijiji i gotovo ih je nemoguće morfološki i funkcionalno razlikovati od rezidentnih makrofaga (aktivirana mikroglijija) te zajedno s njima sudjeluje u uklanjanju stanica i ostataka neutrofila i nekrotičnih stanica (84).

Limfociti pak ulaze u tkivo nakon otvaranja krvno-moždane barijere te se uključuju u komunikaciju s ranije spomenutim dendritičkim stanicama (85). Točan vremenski slijed pojave pojedinih podvrsta limfocita tijekom ishemijskog oštećenja nije poznat, kao ni njihov krajnji učinak (86).

Pojedine stanice i signalne molekule uključene u upalu, ne mogu se smatrati isključivo neurotoksičnim ili neuroprotektivnim protagonistom postishemijskih zbivanja, već je samo ravnoteža između njihovih „štetnih“ i „korisnih“ učinaka pridonijela konačnom pogoršanju ili oporavku ovisno o fiziološkom i biokemijskom kontekstu trenutno prisutnom u moždanom tkivu (87).

### 1.4. Upala i receptori nalik na Toll

U obrani protiv patogena imunološki sustav uvijek ima na raspolaganju mehanizme urođene i stečene imunosti. Stečena se imunost, specifična za kraljevnjake, oslanja na stvaranje imunološkog pamćenja koje omogućuje prepoznavanje tijelu stranih antigena specifičnim

protutijelima. Dok uroena imunost prisutna i kod beskraljevnjaka, nije na taj način specifična za određenu tvar, već se u svojoj brznoj aktivaciji oslanja na ograničenu skupinu bjelancevina i fagocitne stanice koje prepoznaju konzervirana svojstva patogena (88).

#### 1.4.1. Otkriće i filogenetska konzerviranost

Dok se uroena imunost intenzivno istrađivala od kraja 19. stoljeća, mehanizmi uroene imunosti počeli su se rasvijetljavati tek krajem 1980.-ih godina.

Tad je za otkriće posebnog gena koji kodira razvoj dorzoventralne osi kod vinskih mušica (*Drosophila melanogaster*, Meigen) dodijeljena Nobelova nagrada za fiziologiju ili medicinu Christiane Nüsslein-Volhard i Ericu Wieschausu (89). Uspostavilo se da je isti gen, nazvan Toll (njem. *Toll*, odlično, super, „gubač“), presudan za obranu vinskih mušica od gljivične infekcije (90).

Potom je ustanovljeno da se radi o transmembranskoj bjelancevini (91), koja nalikuje na ljudski receptor za interleukin-1 (92).

Nastao tsunami istrađivanja TLR-ova je pokazao da su receptori nalik na Toll (engl. *Toll like receptors*, TLR) razred evolucijski oduvanih receptora uroene imunosti koji su izrađeni u filogenetskom nizu sve od morskih jevnaca pa do ljudi.

Danas TLR predstavljaju najbolje opisanu skupinu receptora koji prepoznaju uzorak (engl. *pattern-recognition receptors*, PRR), a čini je 13 TLR paraloga kod miševa, odnosno 11 kod ljudi (93).

#### 1.4.2. Struktura i izražaj

Bjelancevine iz TLR obitelji transmembranske su bjelancevine tipa 1 (s jednom regijom koja prolazi kroz membranu i izvanstaničnim N-krajem) (94). Citoplazmatski dio koji pokazuje veliku sličnost s obitelji IL-1 receptora, naziva se Toll/IL-1 (TIR) domena. Osim te sličnosti, izvanstanični se međusobno razlikuju jer domena IL-1 receptora nalikuje na imunoglobuline, dok izvanstanična domena TLR-ova posjeduje leucinom bogata ponavljanja (engl. *leucine-rich repeats*, LRR) (95).

Međutim, nisu svi TLR-ovi prisutni na staničnoj membrani. Dok je to većinom slučaj za TLR1, -2, -4, -5 i -6, receptori TLR3, -7, -8 i -9 izrađeni su u unutarstaničnim odjeljcima (29,45647) (96-98). Međutim, ta podjela nije fundamentalna jer TLR2, -4 i -5 mogu biti internalizirani, a TLR9 se može pojaviti na staničnoj površini (93). Smatra se da su upravo unutarstanični odjeljci (endosomi/lizosomi) mjesto prepoznavanja sastavnica patogena pomoću TLR-ova, čak i za membranski izrađene receptore (poput TLR2) (99).

TLR-ovi pokazuju diferencijalni histološki, ali i stanični profil izražaja. Tako primjerice TLR3 ima kritičnu ulogu u penetraciji virusa Zapadnog Nila kroz krvno-moždanu barijeru, a izražaj TLR2 i -4 na endotelnim stanicama uzrokuje specifičnu osjetljivost na bakterijske ligande te usmjerava putujuće leukocite unutar tkiva (93).

Monociti/makrofagi izražavaju sve poznate TLR-ove, dok su na dendritičkim stanicama prisutni svi osim TLR10 i -11. Limfociti izražavaju TLR1, -3, -6, -8, -9 i -10, a endotelne stanice TLR2 i 4 (100).

Izražaj TLR-ova se mijenja unutar pojedine stanice ovisno o izloženosti okolišnom stresu, patogenima ili citokinima. Primjerice lipopolisaharid, LPS i dsRNA (RNA dvostrukog lanca) povećavaju izražaj TLR2 (101). Također, učestvovanje u udjelovanju unutar skupine TLR-ova, pa tako do koordiniranog povećanja TLR2 dovodi i aktivacija neutrofila putem TLR2 (102).

Od stanica prisutnih u CNS-u, očekivano je da mikroglia kao potomak monocitne loze izražava receptore iz TLR obitelji, što je i dokazano. Mikroglia sadrži sve poznate TLR-ove i stimuliraju ih primjerice LPS (TLR4), peptidoglikan (TLR2), poliinozinska-policitidilna kiselina (TLR3) te CpG DNA (DNA koja sadrži citozin i guanin u linearnom slijedu baza) (TLR9) (103).

Na, i sami neuroni podraženi pomoću interferona- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) i deprivacijom glukoze izražavaju TLR2 i TLR4, te navedeni receptori u kortikalnim neuronima posreduju aktivaciju puta aktivirajućeg bjelanjevine Janus kinaza-1 (*engl. Janus Kinase activating protein-1*, JNK-AP-1) i kaspaze-3 (104). Postavlja se pitanje postoje li stanice koje ne izražavaju TLR receptore ukoliko su podražene na odgovarajućim načinima.

### 1.4.3. Signalni put

Ligandi TLR-ova obuhvaćaju molekule koje su svojstvene patogenima (*engl. Pathogen Associated Molecular Patterns*, PAMP), ali i molekularne uzorke povezane s oštećenjem, tzv. alarmine (*engl. danger/damage associated molecular patterns*, DAMP) (105).

Primjeri PAMP-ova koji se vežu na TLR-ove porijeklom su iz bakterija, gljivica, protozoa i virusa kao što su LPS, flagelin (iz bjelanjeva bakterija), peptidoglikan i sl.

Dok su DAMP-ovi koji pokreću signalni put TLR-ova endogeni proizvodi vlastitih raspadnutih stanica nakon nekroze. U njih spadaju molekularni šok proteini (*engl. heat shock protein*, HSP, bjelanjevine toplinskog šoka) -60, -70, -90, HMGB1, heparan sulfat



hijaluronan, LDL, fibrinogen, fibronektin i sl., te se smatra kako bi TLR-ovi mogli imati ulogu i u autoimunim oboljenjima (106).

Usljed prepoznavanja patogena TLR2 stvara heterofilni dimer s TLR1 ili s TLR6, a kod drugih TLR-ova se stvaraju homodimeri (107).

Signalni put TLR-ova započinje TIR domenom te uključuje jednu od 4 adaptorskih bjelaničevina (Slika 4) (108):

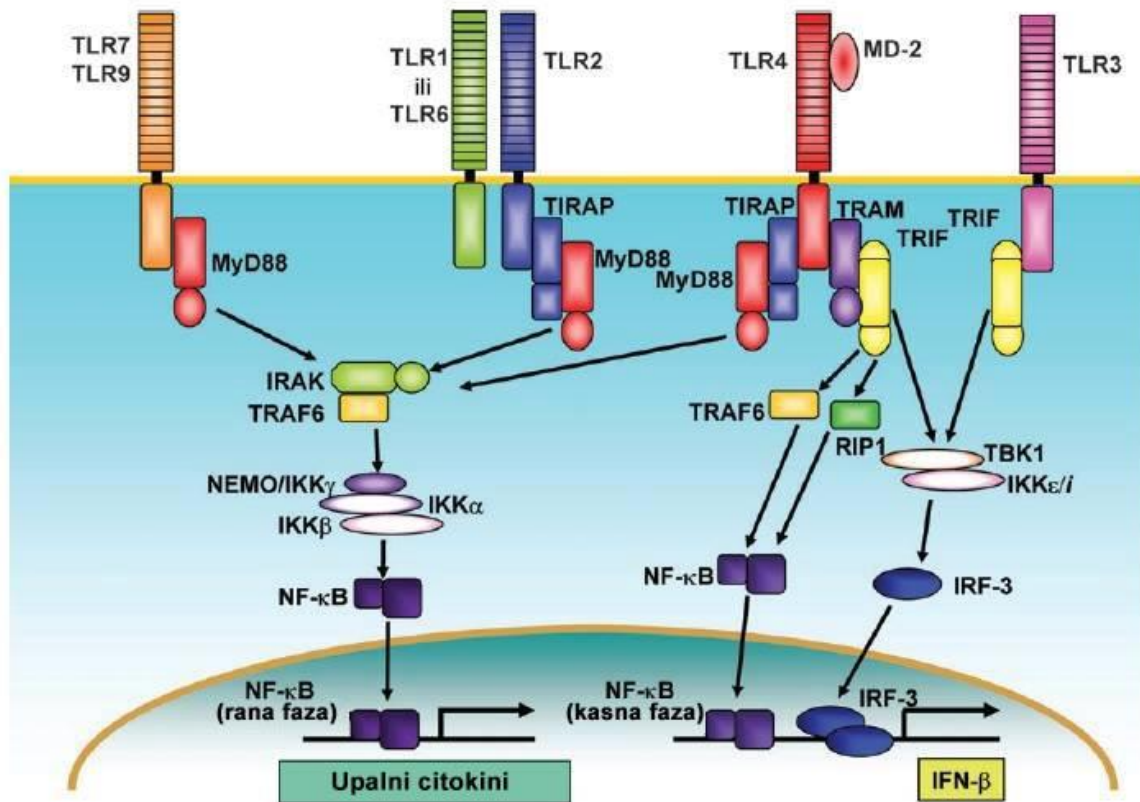
- **MyD88** (*engl. myeloid differentiation factor 88*, mijeloidni imbenik diferencijacije),
- **MAL/TIRAP** (*engl. MyD88-adaptor-like/TIR-associated proteins*, bjelaničevine nalik na MYD88 adaptor povezane s TIR-om)
- **TRIF** (*engl. Toll-receptor-associated activator of interferons*, aktivator interferona povezan s Toll receptorom)
- **TRAM** (*engl. Toll-receptor-associated molecule*, molekula povezana s Toll-om) (109).

Put preko adaptorske molekule MyD88 prihvaća i signal IL-1 receptora, obzirom da i oni posjeduju TIR-domen. MyD88 povezuje kinazu-4 povezanu s receptorom za interleukin-1 (*engl. interleukin-1 receptor-associated kinase 4*, IRAK4) s TLR-om i omogućava fosforilaciju IRAK-1. Aktivirani IRAK-1 se potom veže za imbenik povezan s receptorom za TNF- $\alpha$  (*engl. TNF receptor-associated factor 6*, TRAF6).

Potom se aktiviraju 2 puta: 1. vodi u aktivaciju transkripcijskih imbenika za AP1 preko MAP kinaza; a 2. aktivira TAK1/TAB kompleks (*engl. Transforming growth factor beta-activated kinase 1*, kinaza aktivirana transformirajućim imbenikom rasta beta 1/ *engl. TAK1-binding protein 2*, bjelaničevina koja veže TAK1) koji pojačava aktivnost kompleksa kinaze I $\kappa$ B (*engl. I $\kappa$ B kinaze complex*, IKK). IKK inducira fosforilaciju i posljedičnu degradaciju I $\kappa$ B što dovodi do premještanja nuklearnog imbenika NF- $\kappa$ B (*engl. nuclear factor- $\kappa$ B*, NF- $\kappa$ B) u jezgru (110).

Put preko adaptorske molekule TIRAP/Mal nužan je za aktivaciju TLR2 i TLR4 signalnih puteva koji se odvijaju preko MyD88. No, za TLR4 postoji i put neovisan o MyD88, pa tako i o TIRAP/Mal adapteru, iako je nešto slabiji. Naime, stimulacija TLR4 virusnom DNA, ili pomoću dvostrukog lanca (*engl. double-stranded DNA*, dsDNA), dovodi do aktivacije imbenika transkripcije IRF-3 i aktivaciju kasne faze NF- $\kappa$ B, neovisno o MyD88. Taj put preko IRF-3 dovodi do stvaranja IFN- $\alpha$  (111). IFN- $\alpha$  aktivira *Stat1* i potiče nekoliko gena koji ovise o IFN- $\alpha$ . To ni mehanizmi aktivacije transkripcijskih imbenika putem TLR-ova nisu u

potpunosti poznati i još uvijek su predmet istraživanja, jer se, primjerice, pokazalo da imunološke funkcije TLR-a ovise o kontekstu: u slučaju invazije patogena imaju glavnu ulogu u pokretanju i koordinaciji uinkovitog imunološkog odgovora, dok tijekom aseptičkog oštećenja pokazuju neto djelovanje okidaju i isti upalni odgovor (112).



**Slika 4.** Signalni put TLR-ova započinje na TIR domeni. MyD88 adapter se povezuje s TIR domenom receptora i regrutira IRAK. IRAK potom aktivira TRAF6, koji aktivira IKK kompleks koji se sastoji od IKK $\alpha$  i IKK $\beta$  i NEMO/IKK $\gamma$ . IKK kompleks fosforilira I $\kappa$ B što dovodi do premještanja NF $\kappa$ B u jezgru i poticanja prepisivanja upalnih citokina. TIRAP, drugi adapter za TIR, je uključen u signalni put ovisan o MyD88 za TLR2 i -4. Kod TLR3 i -4 aktivacija IRF-3 i IFN $\beta$  ne ovise o MyD88 za što je potreban treći adaptor za TIR-a, TRIF. Netipični IKK1/IKK $\epsilon$  i TBK1 posreduju aktivaciju IRF-3. TRAM je 4 adaptor za TIR koji je specifičan za TLR4 signalni put neovisan o Myd88/TRIF-u. Preuzeto i prilagođeno iz (110).

### 1.5. Signalni put ovisan o TLR2 u postishemijskoj upali mozga

U postishemijskoj upali, unutar TLR porodice, TLR2 ima najveći i porast izražaja (152-154), a u tome ga slijede TLR4 i -9. Kako je ishemijsko oštećenje mozga primarno aseptično, jedini dostupni ligandi specifični za TLR2 endogeni alarmini, odnosno DAMP-ovi: HSP60, HSP70, HMBG1 i stanični fibronektin (113-115). Spajanjem s ligandom i heterodimerizacijom s TLR1 ili -6 nastupa signalna kaskada kojoj je svrha pojačavanje i modulacija unutarstaničnih

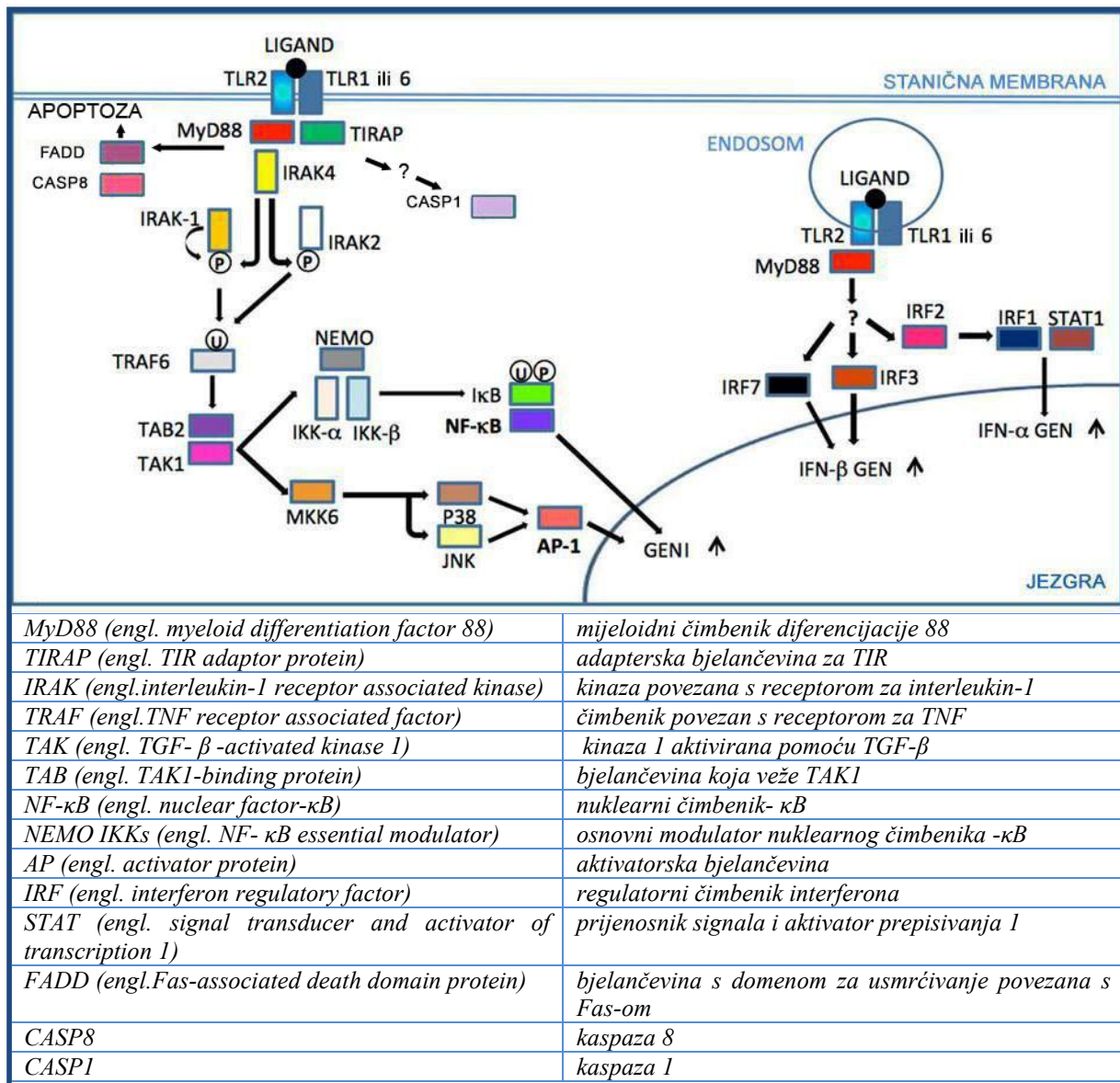
glasnika te postupno dovodi do pojačanog otpuštanja IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 i IL-6 (Slika 5.) (116, 117).

Pored poznatog signalnog puta preko MyD88 koji aktivira MAP kinaze i dovodi do proizvodnje citokina, MyD88 posreduje i proapoptotski signal obzirom da na svom N-kraju sadrži domenu za usmrivanje (*engl. Death Domain, DD*) s kojom se veže na bjelančevinu s domenom za usmrivanje povezanu s Fas-om (*engl. Fas-associated death domain protein, FADD*). Kompleks MyD88 i FADD sam po sebi ima sposobnost uvođenja u apoptozu, a samostalni aktivirani FADD ima sposobnost povezivanja i aktivacije kaspaze-8 (CASP8). Osim toga, TLR2 još nepoznatim putem aktivira i kaspazu-1 (CASP1) (118).

Dosad su se promatrali izražaji gena signalnog puta TLR2 u akutnoj fazi nakon ishemijskog oštećenja mozga te pokazali kako manjak TLR2 u akutnom razdoblju nakon fazišne ishemijske smanjuje veličinu lezije, a ne utječe na regrutiranje granulocita u zahvaćeno područje te da je TLR2 na mikrogliji presudan za čišćenje oštećenja (116, 117, 119). Obzirom da je pokazano i kako pojačani izražaj TLR2 postoji i u kroničnoj fazi nakon ishemijske, jedan od ciljeva ovog doktorata je proiriti analizu modulacije mRNA ovisnih o TLR2 u odgovornoj fazi oporavka (62).

Prethodna istraživanja pod vodstvom prof. Jasne Krifi provedena na miševima s onemogućenim *Tlr2* genom (*Tlr2<sup>-/-</sup>*) pokazala su kako aktivacija stanica mikroglije/makrofaga ovisi o funkcionalnom TLR2 receptoru. TLR2 potom sudjeluje i u proliferaciji stanica mikroglije, te u regrutiranju upalnih stanica monocita/makrofaga i limfocita iz cirkulacije (120). U longitudinalnom praćenju do kasnih vremenskih točaka odgovornog odgovora i kroničnog oporavka pokazalo se kako je veličina ishemijskog oštećenja ipak veća kod miševa bez djelatnog TLR2. Također, kod miševa s onemogućenim *Tlr2* genom smanjeno je nakupljanje astrocita na području oko ishemijske lezije.

Zaključeno je kako odgovor mozga na ishemijsku leziju posredovan TLR2 receptorima uzrokuje stvaranje povoljnog mikrookoliša potrebnog za pravilan razvoj lezije, a pri tom je sve navedene uink TLR2 moguće pozitivno modulirati pomoću dijeta bogate omega-3 nezasićenim masnim kiselinama (121).



**Slika 5.** Po prepoznavanju liganda i dimerizacije s TLR1 ili -6, TIR domena TIRAP-a veže TIR domenu TLR2 i regrutira adapter Myd88. Potom se angažira IRAK sustav te IRAK4 fosforilira (P) IRAK1 koji započinje autofosforilaciju. pIRAK1 se odvaja od kompleksa i uključuje TRAF6. IRAK1 se brzo raspada pa IRAK2 također aktivira TRAF6. Ubikvitinirani (U) TRAF6 okida sekvencu TAB2-TAK1-*IKK*.

Fosforilacija *I $\kappa$ B* i ubikvitinacija *IKK* kompleksa dovodi do njegovog raspada i oslobađanja *NF- $\kappa$ B* koji odlazi u jezgru za regulaciju prepisivanja. TAK1 aktivira i MKK6 za daljnju aktivaciju JNK i p38 dovodeći aktivacije AP1. To potiče prepisivanje gena za citokine. Internalizirani kompleks receptora potaknut ligandom virusa nepoznatim putem uključuje signalni put IRF7/3 za pojačavanje izražaja gena za IFN- $\beta$  ili signalni put IRF2/IRF1/STAT1 za pojačavanje izražaja gena za IFN- $\alpha$ . MyD88 putem FADD aktivira CASP8, a aktivan FADD može dovesti do apoptoze. TLR2 dosad nepoznatim putem povećava razinu CASP1 u stanici. Preuzeto, prilagođeno i izmijenjeno prema (118, 122).

## 1.6. Pretkliničko snimanje laboratorijskih životinja

Zajedno s razvojem životinjskih modela za bolesti ljudi raste i potreba za neinvazivnim praćenjem patofizioloških procesa samog oboljenja, ali i primjenjene potencijalne terapije na pojedinoj životinji. Postojale su tehničke zapreke za u inkovitu uporabu modela, obzirom na malu veličinu glodavaca kao najčešće upotrebljivanih laboratorijskih životinja, te potrebu za velikom prostornom razlučivošću. Razvojem tehnologija s pojačanim omjerom signala i osjetljivima te snažnijim detektorima, danas se u praćenju oporavka miševa nakon ishemijskog oštećenja uspješno koriste oslikavanja pomoću:

- mikrokomputerizirane tomografije (sa i bez kontrasta, *engl. Computed Tomography, CT*) (123);
- mikro magnetne rezonancije (sa i bez kontrasta, *engl. micro Magnetic Resonance Imaging, MRI*) (123);
- tomografije emisije pozitrona (*engl. positron emission tomography, PET*) (124);
- kompjuterizirane tomografije pojedinačnih fotona (*engl. single photon emission computed tomography, SPECT*) (125);
- snimanja Čerenkovljeve luminiscencije (*engl. Cerenkov luminescence Imaging, CLI*) (126);
- snimanja bioluminiscencije (*engl. bioluminescence imaging, BLI*) (127);
- snimanja fluorescencije (*engl. fluorescence live imaging, FLI*) (127);

Bioluminiscencija je ipak jedina neinvazivna metoda kojom je moguće praćenje izražavanja pojedinih gena *in vivo*, koja je zbog svoje osjetljivosti, prilagođena za životinje, te lako za korištenje u usporedbi s ostalim modalitetima oslikavanja (128).

### 1.6.1. Primjena bioluminiscencije u biomedicinskim istraživanjima

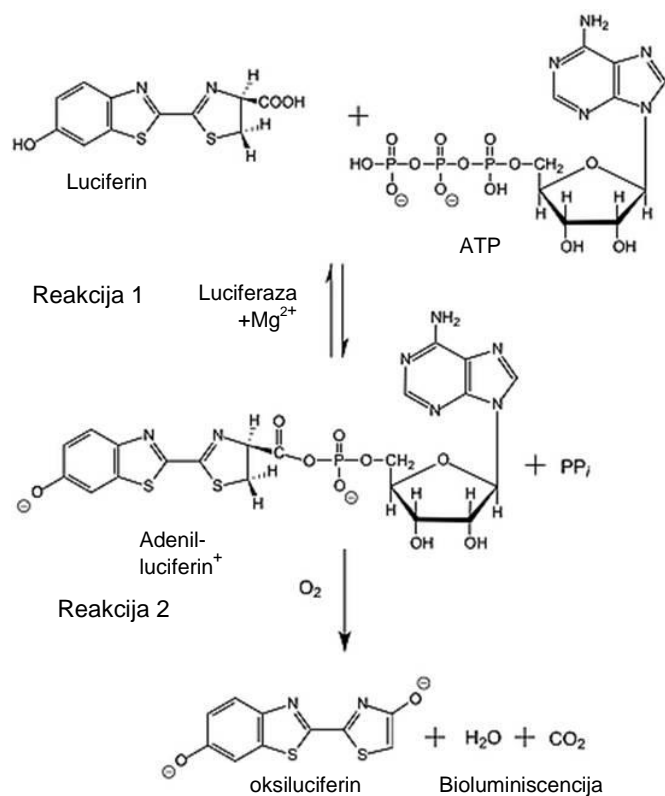
Bioluminiscencija je oblik kemiluminiscencije prisutan u brojnim morskim životinjama, insektima i bakterijama (Slika 6).

Najraniji izvještaji o promatranju bioluminiscencije postoje u religijskim tekstovima Indije i Kine, dok je na Zapadu Aristotel prvi opisao „hladnu svjetlost“ promatrajući i morske životinje oko 350. godine p.n.e. (129).

Moderna znanost o bioluminiscenciji započela je 1885. kad je prvi put u laboratorijskim uvjetima uspostavljena reakcija luciferina i luciferaze (*lat. lucem ferre*, svjetlo-nošenje).

Najproučavaniji sustav bioluminiscencije pripada Sjevernoameričkoj krijesnici (*Photinus pyralis*, L.) te su na toj vrsti u posljednjih 50 godina ustanovljene osnove bioluminiscentnih

supstrata i njihovih reakcija (128). Njezin enzim, luciferaza krijesnice je prvi kloniran 1984., a ubrzo je slijedilo i kloniranje bakterijskih luciferaza i apoakverina iz meduza (130).



**Slika 6.** Shematski prikaz reakcije bioluminiscencije koja se odvija u 2 faze. Prva je redukcija hidroksilne skupine uz pomoć enzima luciferaze i ATP-a, čiji produkt u prisutstvu molekularnog kisika spontano biva oksigeniran i cikliziran u oksiluciferin koji je u singlet pobuđenom stanju. Prilikom jednostruke relaksacije dolazi do emisije fotona, vode i ugljikovog dioksida. Preuzeto i prilagođeno prema (131).

1995. godine Contag i suradnici su prvi put *in vivo* pratili bioluminiscenciju na sisavcima, miševima inficiranim salmonelom koja izražava luciferazu. To im je omogućilo praćenje razvoja i tijeka infekcije u stvarnom vremenu, bez fiksiranja životinje u pojedinim vremenskim točkama (132).

### 1.6.2. Oslikavanje bioluminiscencije na modelu ishemijskog oštećenja mišjeg mozga

Ubrzo su stvoreni i sami transgeni miševi u kojima je gen za luciferazu poslužio umjesto dotad prisutnog reportera beta-galaktosidaze (gen Lac-Z). Prvi transgeni miševi za praćenje izražavaju gena bioluminiscencijom prikazivao je aktivaciju gena za Nf-kB koji ima ulogu

regulatora imunosti te potiče prepisivanje preko 150 različitih citokina, imunoreceptora, bjelaničevina akutne reakcije, regulatora staničnog ciklusa i apoptoze (133).

U posljednjih 20 godina razvijeno je nekoliko transgeničnih mišjih modela bioluminiscencije i fluorescencije specifičnih za praćenje upale, oštećenja i stresa neurona te njihovog oporavka.

Između ostalih namjena, reporterski sustavi korišteni su kao biomarkeri aktivnih patoloških događaja nakon ishemijskog oštećenja (62, 120, 134); za provođenje testa probira novih biokompatibilnih molekula (135); te za analizu patogenih procesa u ranoj fazi kao i za praćenje u inkubitosti terapije u kroničnim neurološkim poremećajima (136, 137).

Tako je, primjerice, u već ranijem spomenutom istraživanju korišten reporterski sustav *Tlr2-luc-Gfp* za prikaz aktivacije mikroglije u akutnim vremenskim točkama nakon ishemijske lezije (62).

### **1.6.3. Snimanje izražaja *Gap43* u mozgu**

Promatra li se funkcionalni oporavak i praćenje neurološkog deficita, u kojoj je osnovni preflivljavanje i umrežavanje neurona, bilo je potrebno pronaći i odgovarajući i reporterski sustav specifičan upravo za navedene stanice u podrađenom aktiviranom stanju.

Kao gen kandidat pokazao se *Gap43* obzirom na svoj povećani izražaj nakon oštećenja aksona i regenerativnog odgovora u zrelom središnjem živčanom sustavu (138).

#### **1.6.3.1. Izražaj gena *Gap43* tijekom embrionalnog razvoja i regeneracije neurona**

*GAP43* (engl. *growth-associated protein-43*, bjelaničevina povezana s rastom 43, poznata i kao B50, F1, neuromodulin, pp46 i P-57) je bjelaničevina povezana s rastom neurona tijekom razvoja i regeneracije živčanog sustava. Potiče nakupljanje F-aktina u neuritima (aksonima) čime doprinosi izgradnji citoskeleta (139, 140). Izražaj gena *Gap43* je najveći i tijekom kritičnih razdoblja razvoja živčanog sustava (141, 142)

Perinatalno je izražen u svim neuronima, no njegov izražaj opada sa smanjenjem arborizacije aksona i sinaptogeneze te preostaje samo u regijama visoke plastičnosti, kao što su hipokampus i njužna lukovica (olfaktorni bulbus) kod miševa (143).

Također, izražaj *Gap43* je izrazito pojačan kod odraslih ozlijeđenih neurona kao dio regeneracije, što je opisano kod ozljede perifernih živaca, kralježnice, ali i mozga (138, 144-146). Osim toga, zanimljivo je kako je poremećaj regulacije *Gap43* prisutan u

neurodegenerativnim poremećajima, kao što su Alzheimerova bolest, multipla skleroza i amiotrofična lateralna skleroza (147-151).

Prethodna istraživanja kažu da ukazuju kako je povećan izražaj *Gap43* prikladan biljezak za procjenu oštećenja aksona i regenerativnog odgovora neurona u zreлом središnjem živčanom sustavu (138).

Nedavno se pokazala i nova uloga bjelancevine GAP43 kao supstrata za kaspazu-4 (CASP3). Također, mutacija *Gap43* gena uzrokuje smanjenu endocitozu receptora 1-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline (engl. *1-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*, AMPA) dovodeći do poremećene dugotrajne depolarizacije na razini postsinaptičke membrane (152).

Kako bi se istražila prostorno-vremenska dinamika indukcije *Gap43* u oštećenju mozga stvorena je transgenična mišja linija koja sadrži bicistronski reporterski sustav (luciferaza 2, luc2; zelena fluorescentna bjelancevina, green fluorescent protein, GFP) pod izražajem promotora za *Gap43* u Laboratoriju Zavoda za psihijatriju i neuroznanost Istraživačkog centra Sveučilišta Laval u Quebecu, u kojemu je proveden dio istraživanja prikazanog u ovoj disertaciji (vidi poglavlje Uzorci i postupci, Transgenična mišja linija GAP43-luc/gfp).

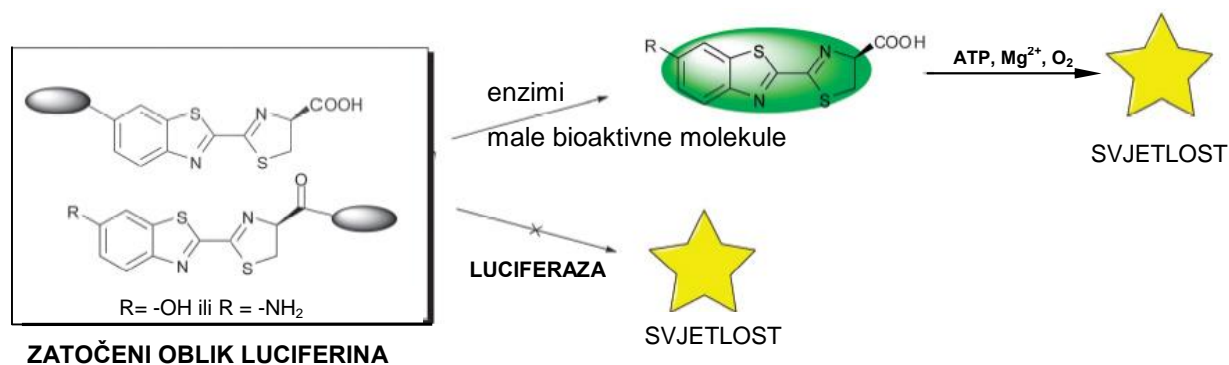
Pri tom je gen za izražaj GFP-a svrhovito umetnut tek nakon gena za luciferazu, kako bi se prepisivao u manjem broju kopija, obzirom da se, za razliku od luciferaze, GFP zbog duljeg vremena poluživota nakuplja u citoplazmi i time slabije odražava dinamiku izražaja ciljnog gena.

Sustav je potvrđen promatranjem izražaja gena *Gap43* tijekom embrionalnog razvoja kad je normalno prisutan, ali je ustanovljena i postishemijska dinamika istog gena s porastom u akutnom razdoblju i odgođenim blagim porastom izražaja (127).



#### 1.6.4. Zatočeni oblik luciferina kao biljeg aktivnosti cjepajućih bjelančevina apoptotičkog puta

Zahvaljujući i daljnjem razvoju tehnologije bioluminiscencije, nastao je itav niz različitih supstrata za luciferazu krijesnice. Među njima je i modificirani oblik luciferina koji je svojim dodatnim sekvencama aminokiselina (tzv. zatočeni oblik luciferina) specifičan supstrat za pojedine cjepajuće enzime (Slika 7) (128).



**Slika 7.** Idejni dizajn zatočenog oblika luciferina na kojem se nalaze male biomolekule koje se prije reakcije s luciferazom moraju otcjepiti pomoću cjepajućih enzima. Preuzeto i prilagođeno po (128).

Kako bi se istrafilo jesu li aktivirani neuroni istovremeno podložni apoptozi, osnovnom modelu transgeni nog *Gap43-luc/gfp* mi-a pridodan je pristup modificiranim supstratom koji se oslobađa samo u prisutstvu cjepajućih bjelančevina CASP3/7 koje su ujedno i biljezi apoptotičkog puta.

Supstrat je modificiran tako da je na luciferin dodana konzervirana sekvenca koju specifično prepoznaju CASP3 i -7, a sastoji se od tetrapeptida Asp-Glu-Val-Asp (DEVD).

Taj komercijalno dostupan supstrat, VivoGlo<sup>®</sup> Caspase-3/7 Substrate (Z-DEVD-Aminoluciferin, natrijeva sol, Promega) se ranije koristio u *in vitro* testovima aktivnosti kaspaza optičkim mjeračima (153).

Njegova primjena u živom mišu koji selektivno izražava luciferazu u odabranoj populaciji neurona predstavljala bi osjetljiv pokazatelj intenziteta zbivanja nakon ishemijskog oštećenja i na primjenu odgovarajućih terapijskih pristupa u točno određenom vremenskom prozoru. Takva bi orijentacija mogla poslužiti u poboljšanje istraživanja neuroprotektivnih lijekova koji su se ranije primjenjivali neovisno o molekularnim zbivanjima unutar neurona.

## **2. HIPOTEZA**

Hipoteza ovog istraživanja bila je da djelovanje TLR2 nakon ishemijskog oštećenja mišjeg mozga potiče funkcionalni oporavak i reaktivnu sinaptogenezu.

### 3. CILJEVI RADA

#### 3.1. Opći cilj

Opći cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj TLR2 kao posrednika urođenog upalnog odgovora na oporavak miševa i sinaptičku plastičnost nakon ishemijske ozljede.

#### 3.2. Specifični ciljevi

- I. Odrediti razlike u funkcionalnom oporavku nakon MCAO kod miševa divljeg tipa (C57Bl/6) i miševa s onemogućenim *Tlr2* genom.
- II. Odrediti razlike u reaktivnoj sinaptogenezi u mišjem mozgu nakon MCAO između miševa divljeg tipa (C57Bl/6) i miševa s onemogućenim *Tlr2* genom.
- III. Odrediti razlike u gustoći i neuralne mreže u kori mišjeg mozga nakon MCAO između miševa divljeg tipa (C57Bl/6) i miševa s onemogućenim *Tlr2* genom.
- IV. Odrediti razlike u angiogenezi u kori mišjeg mozga nakon MCAO između miševa divljeg tipa (C57Bl/6) i miševa s onemogućenim *Tlr2* genom.
- V. Odrediti značaj kolokalizacije GAP43 i CASP3 kao biljega intenziteta upalnih zbivanja nakon ishemijskog oštećenja.

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Usklađenost s etičkim smjernicama i zakonskim propisima**

Svi postupci provedeni za ovaj doktorski rad odobreni su od Etičkog povjerenstva Sveučilišta u Zagrebu, Medicinski fakultet i u skladu su s nalogima Etičkog kodeksa Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama, koji je usklađen sa nalogima Međunarodnog vijeća za znanost o pokusnim životinjama (International Council for Laboratory Animal Science).

Istraživanje je provedeno u skladu s odredbama Zakona o zaštiti životinja (NN 135/06) i Pravilnika o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa (NN 176/04).

Svi eksperimentalni postupci izvedeni u Kanadi odobreni su od Etičkog odbora za brigu o životinjama Sveučilišta Laval (Laval University Animal Care Ethics Committee), te su u skladu s Vodičem za skrb i uporabu pokusnih životinja Kanadskog vijeća za skrb o životinjama (The Guide to the Care and Use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal Care) (154).

### **4.2. Plan istraživanja s vremenskim točkama**

U istraživanju je korišteno ukupno 155 miševa.

Vremenske točke koje su se proučavale su sam dan izazivanja ishemije (0) za mjerenje početnih vrijednosti te 1, 3, 4, 7, 14 i 28 dana nakon MCAO (Tablica 3).

Za procjenu veličine ishemijske lezije korištena su po 3 *Gap43<sup>tg</sup>* miševa u 2 vremenske točke (1,4 dana) (ukupno 6 miševa).

Za proučavanje funkcionalnog oporavka odabrane su vremenske točke od 3,7,14 i 28 dana te su oblikovane 4 pokusne skupine. Pojedine skupine su se sastojale od 10 miševa divljeg tipa C57Bl/6, 10 miševa s onemogućenim *Tlr2* genom (skraćeno *Tlr2<sup>-/-</sup>*), a kontrolne skupine su se sastojale od lažno operiranih miševa divljeg tipa (5 miševa) i lažno operiranih *Tlr2<sup>-/-</sup>* (5 miševa) (ukupno 30 miševa).

Za proučavanje broja aksona 28 dana nakon MCAO oblikovale su se 4 pokusne skupine s Thy1 miševima s MCAO (4), Thy1Tlr2<sup>-/-</sup> miševima s MCAO (4), te kontrolne skupine s lažno operiranim miševima Thy1 (3 miša) i lažno operiranim Thy1Tlr2<sup>-/-</sup> miševima (3 miša) (ukupno 14 miševa).

Za izolaciju mRNA za kvantitativni real-time RT-PCR korištena su po 3 miša po genotipu (2 genotipa WT, Tlr2<sup>-/-</sup>) po vremenskoj točki (4 vremenske točke: 0, 3, 7, 28 dana) (ukupno 24 miša).

Za izolaciju bjelancevina za Western blot korišteno je po 5 miševa po genotipu (2 genotipa: WT, Tlr2<sup>-/-</sup>) po vremenskoj točki (5 vremenskih točaka: 0, 3, 7, 14, 28 dana) (50 miševa).

Za procjenu izražavanja i kolokalizacije GAP43 i CASP3 korišteno je po 5 Gap43tg u 3 vremenske točke (0, 1, 4 dana) (ukupno 15 miševa).

Za pokuse snimanja bioluminiscencije korištena su ukupno 4 *Gap43-luc/gfp* transgeni na miša (skraćeno u tablici Gap43tg).

Etikete na kraju točke tijekom pokusa dostiglo je 5 flivotinja, te su one uklonjene iz ispitivanja. Na temelju praćenja perfuzije teritorija MCA pomoću LDF-a iz ispitivanja je uklonjeno 7 flivotinja.

**Tablica 3.** Plan istraživanja s navedenim brojem životinja i genotipom. Obojena polja iste boje označavaju da su za pojedini postupak korištene iste životinje. WT- divlji tip C57Bl/6; Gap43tg-Gap43-luc/gfp transgenični miševi; Tlr2<sup>-/-</sup> miševi s onemogućenim Tlr2 genom; Thy1- miševi s izražajem YFP pod Thy1 promotorom; Thy1Tlr2<sup>-/-</sup> - miševi s izražajem YFP pod Thy1 promotorom s onemogućenim Tlr2 genom.

Postupak	Vrijeme nakon MCAO								
	-14 dana	-7 dana	0 dana	1 dana	3 dana	4 dana	7 dana	14 dana	28 dana
Tjelesna teflina	15 WT 15 Tlr2 <sup>-/-</sup>								
Neurološki deficit									
Ubrzavaju i rotarod									
Schallertov cilindar									
Y-labirint									
Bilateralna taktilna stimulacija									
Snimanje bioluminiscencije			4 Gap43tg						
Procjena veličine ishemijskog oštećenja				3 Gap43tg		3 Gap43tg			
GAP43 CASP3 kolokalizacija			5 Gap43tg	5 Gap43tg		5 Gap43tg			
GAP43 IOD									
CASP3 IOD									
Br. GAP43 pozitivnih stanica									
Br. CASP3 pozitivnih stanica									
q RT-PCR			3WT 3Tlr2 <sup>-/-</sup>		3WT 3Tlr2 <sup>-/-</sup> /-		3WT 3Tlr2 <sup>-/-</sup> /-		3WT 3Tlr2 <sup>-/-</sup>
Western Blot			5WT 5Tlr2 <sup>-/-</sup>		5WT 5Tlr2 <sup>-/-</sup> /-		5WT 5Tlr2 <sup>-/-</sup> /-	5WT 5Tlr2 <sup>-/-</sup> /-	5WT 5Tlr2 <sup>-/-</sup>
Analiza gustoće aksona									7Thy1 7Thy1Tlr2 <sup>-/-</sup>
Analiza krvnih filia									/-

### 4.3. Pokusne životinje

U istraffivanju su korišteni miševi stari od 2 do 4 mjeseca i to isključivo mufljaci kako bi se izbjegao neuroprotektivni učinak estrogena kao važni faktor posredne povezanosti (134).

Sojevi koji su se koristili u pokusima su sljedeći:

- I. miševi divljeg tipa C57Bl/6NCrl (Charles River, Boston, MA, US) ó dalje u tekstu: **WT** (*engl. Wild Type*);
- II. miševi s onemogućenim Tlr2 genom B6.129-Tlr2<sup>tm1Kir</sup>/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, US) ó dalje u tekstu: **Tlr2<sup>-/-</sup>** (*engl. Tlr2 knock out*)
- III. miševi *Gap43-luc/gfp* s dvostrukim bicistronskim reporterskim sustavom s luciferazom i zelenom fluorescentnom bjelanjkom (*engl. Green Fluorescent Protein, GFP*) ó dalje u tekstu: **Gap43-luc/gfp**
- IV. homozigoti za B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J; (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, US) s reporterskim sustavom žute fluorescentne bjeljanke (*engl. Yellow Fluorescent Protein, YFP*) ó dalje u tekstu: **Thy1**
- V. miševi TLR2<sup>-/-</sup> B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J, dobivenim križanjem Tlr2<sup>-/-</sup> i Thy1 miševa ó dalje u tekstu: **Thy1Tlr<sup>-/-</sup>**

Miševi su se uzgajali na Hrvatskom institutu za istraffivanje mozga i Sveučilištu Laval u Quebecu, Kanada.

#### 4.3.1. Miševi divljeg tipa C57Bl/6NCrl (WT)

Visoko srodni soj C57BL je dobiven prvi put 1921. godine pod vodstvom Clarencea Cooka Littlea na Institutu Bussey za istraffivanja u primijenjenoj biologiji (Bussey Institute for Research in Applied Biology, US). Ti su miševi prethodno uzgajali u komercijalne svrhe u centru za uzgoj goveda Abby Lathrop (155).

Smatraju se visoko srodni, što znači da su proizvod sparivanja više od 20 uzastopnih generacija braće i sestara. Tako njihovi potomci posjeduju visok stupanj genetske i fenotipske ujednaenosti.

Podsoj C57Bl/6 odvojio se od C57Bl/10 oko 1937. godine te postao najpopularniji za uporabu u znanstvenim istraffivanjima od svih preflivjelih podsojeva. To je postao inercijom: velik broj podsojeva istraffivanja koja su proizvedena na njemu, dovela su do daljnjih još opsefnijih istraffivanja. Dostupni su za nabavku u više od 20 ustanova koje ih uzgajaju diljem

svijeta. Laboratorij za neurogenetiku uzgaja miševe kupljene od tvrtke Charles River, te je puni naziv tog podsoja C57Bl/6NCrl.

Krznom im je crne boje. Ostale važne značajke su visoko preferiranje morfina i alkohola, niska incidencija tumora mlije ne flijezde, otpornost na audiogene napadaje, visoka podložnost razvijanju ateroskleroze inducirane dijetom, visoka incidencija mikroftalmije, visoka podložnost razvoju kroničnog ulceroznog dermatitisa i gubitka sluha uzrokovanog bukom. Otporni su na zračenje, anafilaktički šok. Prosječna veličina legla je 6-8 mladih, a odvajanje od legla nastupa s 20 dana starosti (155). U daljnjem tekstu rada se označavaju kao divlji tip, odnosno WT (*engl. Wild Type*).

#### **4.3.2. Miševi s onemogućenim *Tlr2* genom (*Tlr2*<sup>-/-</sup>)**

Miševi s onemogućenim *Tlr2* genom (*Tlr2*<sup>-/-</sup>) na C57Bl/6 podlozi su nabavljeni od tvrtke The Jackson Laboratory, soj B6.129-*Tlr2*<sup>tm1Kir</sup>/J. Vektor s genima za rezistenciju na neomicin i timidin kinazu *Herpes Simplex* virusa ciljano prekida gensku sekvencu koja kodira C-kraj izvanstanične i dio transmembranske domene. Konstrukt je elektroporiran u embrionalne stanice soja 129/SvJ. Embrionalne stanice koje su ispravno ugradile konstrukt su potom injicirane u blastocistu miša soja C57Bl/6.

Homozigoti su normalne veličine, ne pokazuju krupne tjelesne anomalije ili anomalije ponašanja, no prilikom podražaja antigenima spiroheta, kao što je LPS, ne razvijaju simptome bolesti jer ne proizvode TNF-alfa, ni IL-6 (156).

#### **4.3.3. Transgenična mišja linija *Gap43-luc/gfp***

Transgeni na mišja linija *Gap43-luc/gfp* generirana je na Platformi za generiranje transgeni miševa u sklopu Istraživačkog centra Kliničkog bolničkog centra Sveučilišta Laval (CHUL), na C57Bl/6 podlozi.

Fragment od 1.7 kb koji odgovara reporterskom genu za luciferazu (*luc2*) iz vektora *pGL4* (Promega, Madison, WI) i fragment duljine 0.7 kb koji odgovara reporterskom genu za zeleni fluorescentni protein AcGFP (*Aequorea coerulea* green fluorescent protein) iz vektora *pAcGFP* (BD Biosciences, Mississauga, ON) su umetnuti u vektor koji nosi sekvencu, vektor unutarnjeg mjesta ulaska ribosoma (*engl. internal ribosome entry site, pIRES*) (BD Biosciences). Zatim je fragment duljine 10 kb koji sadrži *Gap43* promotor kloniran u rekombinantni vektor *pIRES-Luc2-AcGFP* (Slika 8). Transgeni *Gap43-luciferaza2-Gfp* su



izolirani kao fragment *SpeI/ClaI* i mikroinjektirani u mu-ki pronukleus oplo ene oocite C57BL/6(127).



**Slika 8.** Shematski prikaz DNA konstrukta korištenog za generiranje *Gap43-luc/gfp* transgeničnih miševa. *Gap43* promotor duljine 10 kb ugrađen je u rekombinantni vektor koji sadrži reporterske gene za luciferazu i zeleni fluorescentni protein na obje strane unutarnjeg mjesta ulaska u ribosom (IRES). Preuzeto i prilagođeno prema (127).

#### 4.3.4. Linija miševa B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J

Soj B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J je poznat i pod nazivom Thy-1 YFP-16 (skraćeno Thy1). Proizveo ga je Joshua R. Sanes, sa Sveučilišta Harvard, US na podlozi C57BL/6 te donirao tvrtki The Jackson Laboratory.

Soj je dobiven insercijom transgena. Transgen sadrži gen za YFP pod regulacijom elemenata dobivenih od gena za antigen timocita 1 (eng. *Thymus cell antigen 1*, *Thy1*). Regulatorni elementi se sastoje od fragmenta od 6,5 kB iz 5' dijela *Thy1* gena koji se prostire od promotora do introna nakon egzona 4. Egzon 3 i njegovi introni nisu uključeni u sastav transgena.

Ova transgeni na liniji izražava flutu fluorescentnu bjelanjku (eng. *yellow fluorescent protein*, YFP) u visokoj razini u motornim i osjetnim neuronima, te podvrstama neurona središnjeg živčanog sustava. Transgeni na liniji tako posjeduju snažan i specifičan vitalni bilježak aksona, a izražava ga već od srednje gestacijske dobi(157).

Laboratorij za neurogenetiku Hrvatskog instituta za istraživanje mozga dobio je miševe za daljnji uzgoj i istraživanje od tvrtke The Jackson Laboratory(158).

#### 4.3.5. Linija miševa Tlr2<sup>-/-</sup> B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J

Soj Tlr2<sup>-/-</sup> B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J (skraćeno Thy1Tlr2<sup>-/-</sup>) dobiven je sparivanjem soja Tlr2<sup>-/-</sup> i Thy1 kroz 2 generacije te daljnjim sparivanjem s Tlr2<sup>-/-</sup>. Miševi su se za sparenja i pokuse identificirali pomoću lančane reakcije polimerazom.

#### 4.4. Kriteriji za isključivanje životinja iz ispitivanja

Kriteriji za isključivanje životinja iz ispitivanja su bili sljedeći:

- I. Izostanak reperfuzije prikazano laserskim dopplerom
- II. Opsefno krvarenje tijekom zahvata
- III. Trajanje zahvata  $\times$  15 minuta
- IV. Dosezanje humane krajnje točke (osim izoliranog izostanka uspravljanja)
- V. Krvarenje ustanovljeno *post mortem* na bazi lubanje ili u moždanom parenhimu

Kriterij pod IV. točka kom zahtijeva dodatno pojačavanje. Na dosezanje humane krajnje točke u životinji znakovi moribundnog stanja životinje(159):

- a. Nesposobnost uzimanja vode i hrane
- b. Brzi ili znatan gubitak težine (>20%)
- c. Odsustvo voljnih reakcija na podražaj
- d. Otežano disanje
- e. blijeda ili anemija (bljedilo)
- f. Krvarenje iz bilo kojeg tjelesnog otvora
- g. Nesposobnost uspravljanja
- h. Zgrčeni polofaj
- i. Poliurija ili anurija
- j. Atrofija mišića
- k. Tremor, grčevi, kljenut
- l. Produljena hipo- ili hipertermija

U slučaju prisutne izolirane nesposobnosti uspravljanja (kriterij g.), životinja nije eutanizirana.

#### 4.5. Genotipizacija miševa

##### 4.5.1. Izolacija DNA iz tkiva

DNA je dobivena iz bioptata uha prikupljenog tijekom obilježavanja miševa oznakama (rupicama) na ušima, prilikom razvrstavanja u kaveze. (engl. *ear punch*) (u Kliničkom bolničkom centru Sveučilišta Laval), ili iz tkiva repa (na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga).

Tkivo uha bilo je uronjeno u 300  $\mu$ l pufera za razgradnju bioptata uha (engl. *ear punch buffer*, priprema: 500  $\mu$ l 10M NaOH, 100  $\mu$ l EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina), do

500 ml ultra ista voda). Uzorci su u navedenom puferu inkubirani 2 sata na 95 °C, a potom uvani na +4 °C do izvo enja genotipizacije.

Tkivo repa je bilo uronjeno u ukupno 500 µl pufera za razgradnju (*engl. lysis buffer*, priprema 400 ml: 20 mL 1M Tris (pH = 8.0), 80 mL 0,5 M EDTA (pH = 8,0, 40 mL 10% SDS; 40 mL proteinaze K, 220 mL ultra ista voda). Uzorci su u navedenom puferu inkubirani preko no i na 56°C, a potom uvani na +4 °C do izvo enja genotipizacije.

#### 4.5.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Genotipizacija mi-eva u injena je metodom lan ane reakcije polimerazom (*engl. Polymerase Chain Reaction, PCR*).

25 µl reakcijske smjese za jedan uzorak sadrflavalo je:

2 µl DNA

2,20 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>

1 µl 20 mM po etnica 1 (navedene u tablici 4. u stupcu „Po etnice za sojō)

1 µl 20 mM po etnica 2 (navedene u tablici 4. u stupci „Po etnice za divlji tip C57Bl/6ō)

0,5 µl 25 mM dNTP

2,5 µl 10X PCR pufer za DNA polimerazu (Applied Biosystems)

0,30 µl 5 U/µl Taq DNA polimeraze (Applied Biosystems)

**Tablica 4.** Početnice koje se stavljaju u reakcijsku smjesu prema sojevima i za kontrolu kod divljeg tipa (WT).

Genotip	Po etnice za soj	Po etnice za divlji tip C57Bl/6
Tlr2-/-	5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC-3' 5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3' (Neo alel)	5'-TGGTTCTTTTCCCAAAGTGG-3' 5'-CAATGGGAATCCTGCTCACT-3'
Gap43	JK3: 5'- GGCGCAGTAGGCAAGGTGGT-3' 5'-GGGCACATCCTCTCATTGT-3' (luc alel)	JK4: 5'-CAGCAGGATGCTCTCCAGTCC-3' 5'-GGGCACATCCTCTCATTGT-3'
Thy1	5' - CGGTGGTGCAGATGAACT T - 3' i 5' - ACAGACACACCCCA GGACA - 3'	5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT -- 3', 5' -GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3'

Reakcija se odvijala u laboratorijskom ure aju za PCR (Eppendorf Mastercycler), pod sljede im uvjetima navedenim u tablici 5.

**Tablica 5.** Programi PCR uređaja za umnožavanje pojedinih alela prema trajanju (T) i temperaturi (°C).

Alel	Po etna denaturacija		30 ciklusa										Zavr-na polimerizacija			
			Denaturacija		Lijepljenje po etnica		Produljivanje lanaca									
	T	°C	T	°C	T	°C	T	°C	T	°C	T	°C				
Tlr2-/- za WT	2'	94	30"	94	30"	58	45"	72	5'	72						
Tlr2-/- (Neo alel)	2'	94	30"	94	30"	61	45"	72	5'	72						
Gap43 (luc)	15'	95	30"	94	30"	65	60"	72	7'	72						
			10 ciklusa					28 ciklusa								
			T	°C	T	°C	T	°C	T	°C	T	°C	T	°C		
Thy1	2'	94	20"	94	15"	65	10"	67	15"	94	15"	60	10"	72	2'	72

Rezultati lan ane reakcije polimerazom prikazani su elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu. Za pripremu gela, agarozna je pomije-ana u 1X TAE puferu za elektroforezu (priprema 10X: 48,4 g Tris, 11,4 ml ledene octene kiseline i 3,7 g EDTA, do 1L deionizirana voda). Nakon zagrijavanja, u otopinu je dodan etidij bromid po etne koncentracije 10 mg/ml, u razrje enju 1/10 000. Gel je izliven u kadice za elektroforezu, a nakon polimerizacije gela u jaflice su naneseni uzorci DNA. Pufer za migraciju tijekom elektroforeze bio je 1X TAE. Elektroforeza se odvijala pod naponom od 10-15mV/cm gela.

#### **4.6. Metoda privremene MCAO kod miša kao model ishemijskog oštećenja mozga**

##### **4.6.1. Osnovne značajke korištenog MCAO modela**

Kao model ishemijskog oštećenja mozga miša korištena je metoda jednostrane privremene intraluminalne okluzije srednje moždane arterije (tMCAO, *engl.* transient Middle Cerebral Artery Occlusion) u trajanju od 60 minuta.

Metoda je općenito prihvaćena u istraživanjima ishemijskoga oštećenja mozga na fivotinjskom modelu budući da ima visoki postotak reproducibilnosti rezultata, relativno nisku smrtnost i manje je invazivna od ostalih metoda (169, 170).

Kako bi se na temelju promjena tjelesne tefline moglo zaključivati o stanju fivotinje nakon MCAO, fivotinjama je izmjerena tjelesna teflina prije samog zahvata.

##### **4.6.2. Inhalacijska anestezija**

Kako kirurški zahvat nije bezbolan, odnosno mišu nanosi bol koja premašuje bol uboda igle, bilo je potrebno miševima uvesti u anesteziju. To se provodilo uvodeći miša u inhalacijsku komoru uz 2% izofluran (Forane®, Abbott, North Chicago, Illinois, USA) u 100% kisiku s protokom od 1,5L/min. Nakon početnog uspavlivanja, miš je bio prenesen u operacijsko polje te se ista anestezija održavala putem inhalacijske maske s protokom jednakim onom za indukciju anestezije.

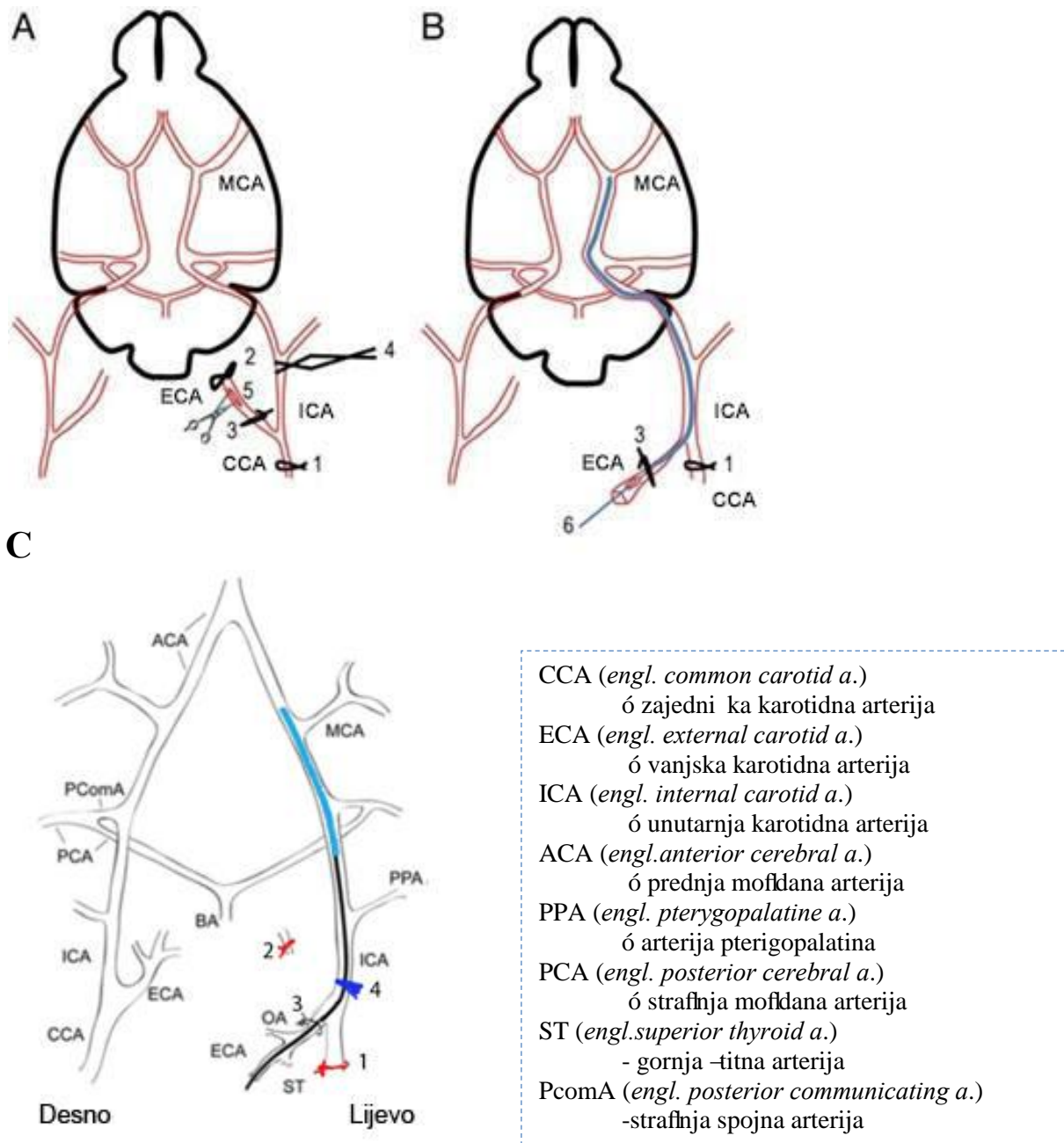
##### **4.6.3. Izbjegavanje čimbenika posredne povezanosti pri MCAO**

Kako bi se smanjili čimbenici posredne povezanosti (*engl. confounding factors*) koji doprinose varijabilnosti veličine oštećenja, operativne zahvate na svim fivotinjama izvodila je ista osoba (autorica).

Obzirom da postoje dokazi u prilog neuroprotektivnog učinka hipotermije miša nakon izazivanja ishemijske ozljede, presudno je održavati tjelesnu temperaturu fivotinje stalnom (160). Tjelesna temperatura održavana je na 37,0 ± 0,5 °C pomoću grijane podloge na kojoj je miš ležao tijekom i nakon operativnog zahvata te anorektalne sonde za detekciju temperature (Moor Instruments, Devon, UK).

Kako bi se spriječila isušivanje nosne sluznice, miševima su po uspavlivanju nosnice zatvorene i premazane zaštitnom masti, belobaza.

#### 4.6.4. Opis MCAO zahvata



**Slika 9.** Shematski prikaz unilateralne privremene okluzije središnje cerebralne arterije pomoću intraluminalnog monofilamenta.

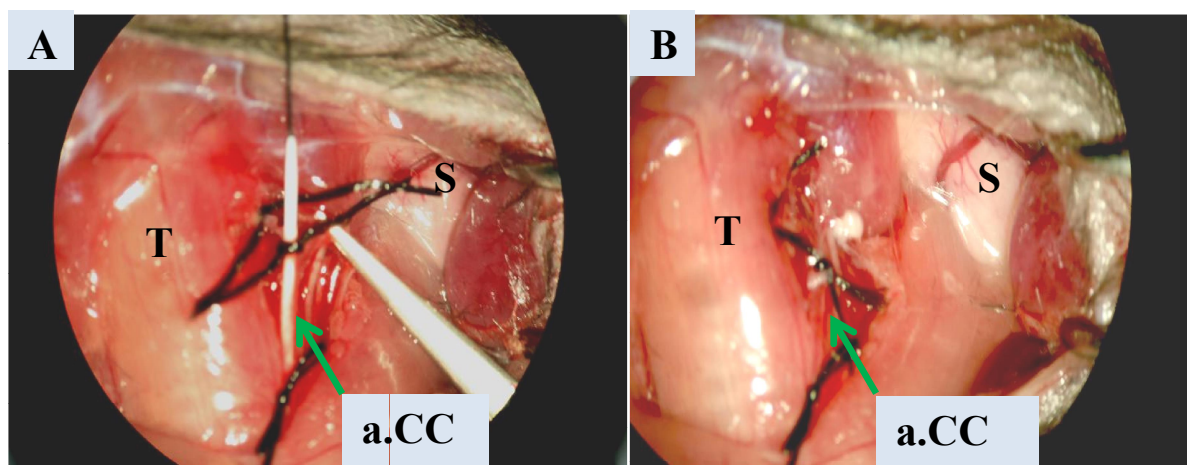
**A)** Položaj prvog čvora (1) na zajedničkoj karotidnoj arteriji (CCA), drugog (2) i (3) čvora na vanjskoj karotidnoj arteriji (ECA), položaj samozatvarajuće pincete (4) i mjesto reza. **B)** Položaj monofilamenta prilikom okluzije kada blokira ulazak krvi u središnju moždanu arteriju (MCA), položaj prvog (1) i trećeg (3) čvora, te mjesto ulaska monofilamenta (6) na vanjskoj karotidnoj arteriji (ECA).

**C)** Pojednostavljeni shematski prikaz postupka MCAO silikonom obloženim filamentom prikazanim u ishodištu srednje moždane arterije (MCA). Preuzeto i prilagođeno prema (161, 162).

Prilikom MCAO zahvata miš je bio položen na leđa, te je bio u inžen rez u području vrata u središnjoj liniji. Meka tkiva i flijezde slinovnice su odmaknute u stranu kako bi se prikazale zajednička, unutarnja i vanjska karotidna arterija. Lijeva zajednička karotidna arterija izdvojena je od okolnog tkiva, n. vagusa i jugularne vene. Na zajedničkoj karotidnoj arteriji prije rana vanja postavljen je prvi vodoravni svilenim koncem debljine 6-0 (Slika 9). Taj vodoravni je privremen, tj. ostavljen je jedan kraj niti u obliku petlje, čime se omogućilo naknadno odvezivanje vora jednim potezom. Nakon postavljanja prvog vora lijeva vanjska karotidna arterija izdvojena je od okolnih struktura, a na njoj je postavljen drugi vodoravni trajni vodoravni, što je distalnije bilo moguće kako bi manevarski prostor na vanjskoj karotidnoj arteriji bio što veći. Treći vodoravni je postavljen labavo, također na vanjskoj karotidnoj arteriji, proksimalno od drugog vora, neposredno uz rani zajedničke karotidne arterije. Nakon postavljanja trećeg vora, lijeva unutarnja karotidna arterija izdvojena je od okolnih struktura, te je privremeno zatvorena uz pomoć posebne Dumont pincete br. 7 (12161-30., Fine Science instruments GmbH, Heidelberg, Njemačka), koja je specifična po tome što se sama zatvara, a uz pomoć primijenjene sile otvara, što je obrnuto od principa klasične pincete. U inžen je maleni poprečni (nepotpuni) kosi (kako bi se povećala površina presjeka) rez između drugog i trećeg vora kroz koji je uvedena monofilamentna nit obložena silikonom, debljine 6-0 (Doccol Corporation, Sharon, MA, USA), te je pogurana proksimalno do rani zajedničke karotidne arterije. Zatim je treći vodoravni pritegnut oko monofilamentne niti koja se sada nalazi u lijevoj vanjskoj karotidnoj arteriji i sefle do rani (Slika 9. A). Nakon toga je u potpunosti prerezana vanjska karotidna arterija na istom mjestu gdje je u inžen nepotpuni rez i uveden monofilament. Uklonjena je Dumont pinceta br. 7, a monofilament je gurnut u unutarnju karotidnu arteriju, a anatomskim slijedom i u Willisov krug, na taj način zaustavljajući protok krvi u početnom dijelu srednje moždane arterije (Slika 9. B). Nit je u pravilu uvedena u duljini od oko 14 mm, mjereći od rani zajedničke karotidne arterije, odnosno do pružanja otpora niti što nam govori da je nit sezala do rani srednje moždane arterije. Naknadno je pritegnut treći vodoravni oko monofilamenta kako se ne bi pomaknuo van uslijed pokreta miša u budnom stanju. Rana je zatvorena posebnim privremenim pri vrsnim spajalicama ili avovima. Miš se potom probudio iz anestezije i premješten je u grijani kavez na 60 minuta. Nakon 60 minuta okluzije srednje moždane arterije, miš je ponovno uspavan u indukcijskoj komori inhalacijskom anestezijom. Uklonjene su privremene pri vrsne spajalice ili avovi, a monofilamentna nit je izvučena do trenutka kada se vrh niti nije približio na udaljenost od oko 2 mm do otvora na vanjskoj karotidnoj arteriji kroz koji je monofilament uveden. Ponovno je postavljena privremena okluzija Dumont pincetom br. 7 na unutarnju karotidnu arteriju, a

potom je filament u potpunosti izvaden iz krvne file. Treći korak potom je vrsto pritegnut kako bi se spriječila naknadno krvarenje. Samozatvarajuća pinceta je potom uklonjena, kao i prvi korak koji je postavljen na zajedničkoj karotidnoj arteriji na samom početku zahvata. Rana je zatvorena uz pomoć spajalica ili trajnim šavovima pomoću 4-0 svilenog konca.

Radi boljeg prikaza sitnih struktura, zahvat je izvaden pod operacijskim mikroskopom s izvorom hladnog svjetla (Slika 10.).



**Slika 10.** Fotografije vidnog polja pod operacijskim mikroskopom. A) Silikonom obloženi monofilament umetnut je kroz vanjsku karotidnu arteriju u zajedničku karotidnu arteriju u smjeru srca. B) Filament je okrenut od srca, u unutarnju karotidnu arteriju i zaustavljen u tom položaju stezanjem končanog čvorića kojeg pokazuje strelica. T – traheja; S – slinovnica; a.CC – a. carotis communis, zajednička karotidna arterija.

Tijekom zahvata korišten je fizični drfla (retraktor) kako bi rubovi rane ostali razmaknuti, a eventualni tragovi krvi bili su uklonjeni uz pomoć sterilnih tampona s namotanom vatom na vrhu. U navedenim postupcima korišten je zasebni set instrumenata koji se dezinficirao, a kod svih materijala gdje je to moguće i sterilizirao u suhom sterilizatoru prije svake operacije kako bi se postigli aseptični uvjeti.

#### 4.6.5. Postoperativna njega

Radi dezinfekcije i pospješivanja zarastanja rana je na kraju zahvata premazana otopinom joda. Kako bi se spriječila dehidracija postoperativno je svakom mišu injicirano 1mL fiziološke otopine dva puta na dan kroz 3 dana, tj. dok je boravio u grijanom kavezu (37°C). Također, svakom mišu bila je osigurana analgezija buprenorfinom 0,1 mL (otopina 0,03 g/mL, doza za miševe 0,05-0,1 mg/kg). Hrana i voda bile su dostupne *ad libitum*. Sedam dana nakon zahvata hrana je bila omekšana vodom i umućena u kašicu kako bi se osiguralo da na vratu potrebnih za flukaciju ne bi dovelo do kaheksije.



#### **4.6.6. Lažno operirane životinje kao kontrole**

Kako bi se umanjio utjecaj posrednih imbenika povezanosti koje sa sobom nosi inhalacijska anestezija i operativni zahvat bez same okluzije, bilo je potrebno koristiti lažno operirane kontrolne flivotinje. Kod lažno operiranih flivotinja zahvat je bio identičan uz umetanje filameta, a izuzeto je tek ostavljanje umetnutnog filameta 60 minuta u srednjoj moždanoj arteriji.

#### **4.6.7. Uporaba laserskog doppler sustava za provjeru protoka u MCA**

Za kontrolu protoka i potvrdu njegovog prestanka tijekom uvježbljavanja MCAO zahvata korišten je laserski doppler sustav sa sondom za male glodavce, engl. Laser Doppler Flowmetry (Moor Instruments, Millwey, Devon, UK). U tu je svrhu bilo potrebno otvoriti koflu glave na mjestu iznad temporalnog mišića i prisloniti sondu uz lubanjsku kost na obojanim mjestu protoka srednjem moždane arterije. Mjerio se početni protok, pad prilikom podvezivanja 1. vora na a. carotis communis, te pad protoka prilikom umetanja filameta. Prilikom reperfuzije mjerila se uspostava početnog protoka kroz 20-30 sekundi. Ukoliko nakon 2 do 3 minute nije nastupila reperfuzija, nego je protok nastavio opadati, flivotinja je bila isključena iz pokusa jer je neizravno zaključeno kako je došlo do probijanja file i krvarenja.

### **4.7. Testovi ponašanja miševa**

#### **4.7.1. Uvjeti za provođenje testova ponašanja**

Radi privikavanja miševa na ispitivače i uređaje za ispitivanje, testovi ponašanja pošli su se provoditi, uz mjerenje tjelesne težine, 2 tjedna prije samog zahvata. Ispitivači su bili slijepi za genotip i tretman flivotinja, odnosno nije im bilo poznato u koju skupinu miševa pripada.

Radilo se u skladu s općim pravilima rada u flivotinjskoj nastambi koja uključuje zabranu hrane, guma za žvakanje, pića i kozmetike. Cijelo vrijeme nosila su se zaštitna odijela, maska i kapa te zaštitne rukavice, a uređaji su se temeljito čistili deterdentsom i alkoholom nakon svake ispitivane flivotinje.

Kako bi se izbjegli imbenici posredne povezanosti (engl. confounding factors) prije i nakon testiranja flivotinje se držale u jednoobraznom okolišu (kavezu s piljevinom s hranom i vodom *ad libitum*). Obzirom da imbenici okoliša mogu utjecati na razinu anksioznosti kod flivotinja, u nastambi i prostoriji za testove ponašanja održavala se stalna temperatura, vlažnost, ventilacija, intenzitet buke i rasvjete. Testiranje se provodilo uvijek u isto doba dana jer kroz dan dolazi do fizioloških i biokemijskih promjena u sklopu cirkadijanog ritma flivotinja.

#### 4.7.2. Procjena neurološkog oštećenja

Pregled za neurološko oštećenje pripada u redovitu procjenu stanja flivotinje nakon MCAO zahvata, kako bi se pratio oporavak flivotinje, ali i utvrdile eventualne humane krajnje točke. Provodi se prema metodi po Garcii (163). Najveći mogući broj bodova je 18, a najmanji 3 boda (Tablica 6).

Spontana aktivnost ocjenjivala se u trajanju od 5 minuta u, za miša, normalnom okruženju (kavezu). Proučavana je spontana aktivnost prilikom istraživanja prostora. Ispitiva se nije pokretao, niti proizvodio buku kako ne bi ometao miša i uzrokovao „smrzavanje“, (engl. freezing) tj. karakteristično ponašanje miša u kojemu se on zaustavi i ukoči, a javlja se u situacijama kada se flivotinja osjeća ugroženom.

Simetrija pokretanja svih udova promatra se na način da se miša drži u zraku, pridržavajući i ga samo za rep. Svi udovi u zdrave flivotinje bili su ispruženi, a posebna pozornost posvećena je pokretanju udova desne strane, obzirom da oštećenje u modelu zahvata je u lijevu hemisferu.

Simetrija ispružanja prednjih udova provodi se tako da miša držimo u zraku, pridržavajući i ga za rep, polagano ga spuštamo do podloge (rub stola), te mu omogućimo hod na prednjim udovima. Zdrava flivotinja je u potpunosti simetrično ispružila prednje udove i hodala na njima, dok bolesna šteta desnu nogu, sporije ju koristi ili ju vuče po podlozi.

Penjanje po zidu flivotinog kaveza provodilo se tako da je poklopac kaveza postavljen pod kutom od gotovo 90 stupnjeva, a miš je postavljen na donju trećinu poklopca. Miš se instinktivno nastoji popeti do vrha, a u prisutstvu oštećenja, to radi sporije ili krčki po rešetki.

Propriocepcija se ispitivala tako da se flivotinja dodirne tupim štapićem s jedne, a potom i s druge strane tijela. Tipičan odgovor zdrave flivotinje uključivao je okretanje glave i pokret cijelog tijela prema štapiću, s ciljem proučavanja i njuškavanja štapića. Flivotinja s neurološkim ispadom zanemarivala je jednu stranu tijela, a navedeni odgovor izostajao je na desnoj strani prilikom dodira štapićem.

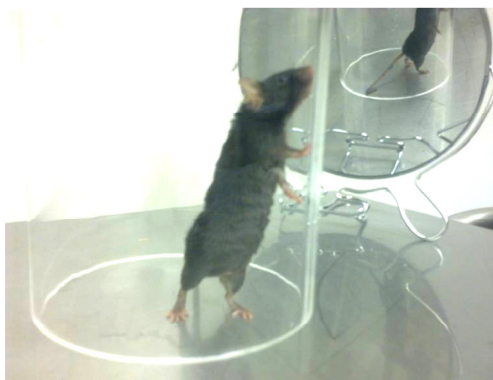
Odgovor na dodir brkova provodio se dodirivanjem brkova na obje strane tupim štapićem. Štapić se proučavao odostraga kako miš ne bi vidio štapić, već bi imao isključivo dodirni podražaj. Zdrava flivotinja pomicala je brkove na dodir i okrenula je glavu u smjeru

podraflaja, a ponekad i pomaknula cijelo tijelo, sve s ciljem istraflivanja i nju-kanja, dok je kod flivotinje koja ima neurolo-ki ispad ta reakcija izostala.

*Tablica 6. Procjena neurološkog oštećenja prema Garcii (163)*

TEST	BODOVI			
	0	1	2	3
<b>Spontana aktivnost (u kavezu, 5 minuta)</b>	Bez pokreta	Slaba aktivnost	Pokre e se, no dodiruje manje od 3 strane kaveza	Pokre e se i dodiruje najmanje 3 strane kaveza
<b>Simetrija pokreta sva 4 uda</b>	Bez pokreta na desnoj strani	Slabi pokreti na desnoj strani	Desna strana se pomi e sporije	Obje strane se pomi u simetri no
<b>Simetrija prednjih udova (pružanje tijekom držanja za rep)</b>	Bez pokreta na desnoj strani	Slabi pokreti na desnoj strani	Desna strana se pomi e sporije	Obje strane se pomi u simetri no
<b>Penjanje po žičanom zidu kaveza</b>	...	Ne penje se	Desna strana je slaba	Normalno penjanje
<b>Odgovor na dodir trupa s obje strane</b>	...	Nema odgovora na desnoj strani	Slab odgovor na desnoj strani	Simetri an odgovor
<b>Odgovor na podražaj brkova</b>	...	Nema odgovora na desnoj strani	Slab odgovor na desnoj strani	Simetri an odgovor

### 4.7.3. Schallertov cilindar



*Slika 11. Miš se uspravlja tijekom testiranja u Schallertovom cilindru.*

Test u Schallertovom cilindru mjeri uporabu prednjih udova za potporu tijela tijekom uspravljanja (Slika 11) (164). Njime se testira koliko flivotinja preferira kori-tenje nezahva enog prednjeg uda za pokrete premje-tanja tijela tijekom spontanog vertikalnog istraffivanja prostora.

Provodi se u cilindru od pleksiglasa dimenzija 12,7 cm u promjeru i 25,4 cm visine (165). Zrcalo iza cilindra zakrenuto pod uglom omogu uje pra enje malih pokreta flivotinje kad nije usmjerena prema kameri.

Testiranje zapo inje stavljanjem flivotinje u cilindar i snimanjem pokreta kroz 180 minuta.

Ponovnim pregledom snimaka s mogu no- u usporavanja ispitiva biljeffi samostalno kori-tenje lijevog/desnog prednjeg uda prilikom dodirivanja zida tijekom punog odizanja, za zapo injanje pokreta cijelog tijela i za ponovno postizanje ravnoteffe. Biljeffi se i samostalna uporaba lijevog/desnog uda za spu-tanje na tlo nakon odizanja. Pored toga, broji se istovremena uporaba oba uda prilikom dodirivanja stjenke tijekom punog odizanja i postrani ne kretnje dufl stjenke te istovremena uporaba oba prednja uda tijekom spu-tanja na tlo nakon odizanja. Ako ispitiva nije mogao odrediti je li za pokret kori-ten jedan ili oba prednja uda, taj se pomak nije brojao. Kretanje po tlu nakon spu-tanja, tj. etveronofno hodanje, ne ulazi u analizu.

Za analizu se koristi ukupni zbroj kretnji te ocjena asimetrije.

Ocjena asimetrije je omjer zbroja kontakata ipsilezionalnim prednjim udom i polovice bilateralnih kontakata sa zbrojem svih kontakata (ipsilezionalnim prednjim udom, kontralezionalnim prednjim udom i bilateralnih kontakata).

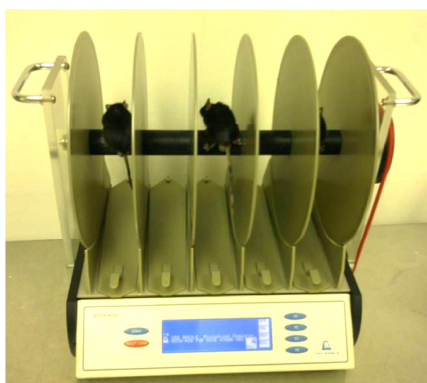
Za bodovanje prilikom promatranja snimke za svaku pojedinu flivotinju se koristi Tablica 7.

**Tablica 7.** Tablica za bodovanje kretnji u Schallertovom cilindru. Prilikom svakog početnog kontakta sa stjenkom, bod dobiva lijevi, desni ili oba uda, ovisno o tome kojim je udom prvo kontaktirana stjenka. Daljnji kontakti po stjenci označuju bod za oba uda. Prilikom povratka na pod bod dobiva lijevi, desni ili oba uda, ovisno o tome kojim se udom miš prvim spustio. Daljnje koračanje po podu se ne boduje

Br. flivotinje:	LIJEVI	DESNI	OBA
stjenka			
pod			

#### 4.7.4. Ubrzavajući rotarod

Svrha rotarod testa je procjena motorne koordinacije i ravnoteže kod glodavaca. Miševi odrflavaju ravnotežu na –tapu koji se okreće i pri tom ubrzava. Mjeri se vrijeme (latencija) koje miš provede uspješno se odrflavaju i na –tapu pri ravnomjernom ubrzanju od 4 do 40 okreta u minuti kroz 300 sekundi.



**Slika 12.** Testiranje na ubrzavajućem rotarodu. Uređaj Rota-Rod Ugo Basile, Milano, Italija.

Za testiranje se koristi uređaj model Rota-Rod, Ugo Basile, Milano, Italija (Slika 12.).

Promjer –tapa je oko 5 cm, a izrađen je od tvrde plastike prekrivene sivom gumenom pjenom s urezima dubine 0.5 mm svaka 2 mm cirkumferencije. Debljina trake za pojedinog miša je 5 cm. Uređaj ima funkcije programiranja ubrzanja, pamćenja programa te prikaza vremena latencije.

Miševi se postavljaju u svoje trake s jednom trakom razmaka između u svake flivotinje te se privikavaju na hodanje po –tapu brzine 4 okreta u minuti. Testiranje započinje kad su svi miševi postavljeni i ritmično hodaju nekoliko sekundi po –tapu. Bilježi se vrijeme (latencija) koje je potrebno da miš izgubi ravnotežu i padne sa –tapa ili prestaje napredovati okretati i se pasivno zajedno sa –tapom.

#### 4.7.5. Obostrani podražaj dodirrom (bilateralna taktilna stimulacija)

Obostrani podražaj dodirrom se koristi za mjerenje jednostranog zanemarivanja i nedostatka detekcije podražaja dodira na zahvaćenoj strani (Slika 13) (165).

Miš je bio stavljen u prazan kavez bez stelje te mu se bila dozvolila 1 minuta za prilagodbe na novi okoliš. Potom je miševina bila uzeta u ruku i lagano se bila postavila u držanje i je za nihalni nabor. Na prednje su šape s ventralne strane bile stavljene naljepnice dimenzija 127x3 mm. Miš je potom bio vraćen u prazan kavez bez stelje te mu je bilo dozvoljeno da ukloni naljepnice koristeći i zube. Mjerilo se vrijeme (latencija) koje je potrebno da prvo kontaktira, te potom i ukloni naljepnicu sa svake šape i to u 5 pokušaja s 30 sekundi odmora između testiranja.



**Slika 13.** Samoljepljive trakice na prednjim šapama za testiranje obostranog podraživanja dodirrom.

Izražavalo se prosječno vrijeme svakog stimulusa oduzimaju i vrijeme od kontaktiranja naljepnice na jednoj strani do njenog uklanjanja te se za daljnju analizu uzimala prosječna vrijednost 5 testiranja (166).

Ocjena asimetrije dobila se izražavajući i postotak testiranja u kojima je ipsilateralni stimulus prvi kontaktiran ili uklonjen u odnosu na sva testiranja ( $2 \times 5 = 10$ ).

### 4.8. Histološka analiza tkiva

#### 4.8.1. Priprema tkiva za histološke analize

##### 4.8.1.1. Izolacija mozga za histološke analize

miševina je uspavana intraperitonealnom injekcijom anestetika 2,5% Avertina te je provedena perfuzijska fiksacija 4% paraformaldehidom (4% PFA) u fosfatnom puferu - PBS (*engl. phosphate buffer saline*) kao fiksativom. Mozak je izoliran u cijelosti, uz očuvane olfaktorne

bulbuse. Tkivo je potom postfiksirano imerzijom u 4% PFA, te nakon 24h premje-teno u 30% otopinu saharoze.

#### **4.8.1.2. Rezanje na kriostatu**

Prije rezanja na kriostatu, mozak je uklopljen u otopinu za rezanje (Tissue Tek, O.C.T, Sakura, US), smrznut na -80°C kako bi se formirao tvrdi blok, koji je potom montiran na drfla kriostata (Leica CM3050 S). Na kriostatu su rezani popre ni (frontalni) rezovi debljine 30 µm, koji su odmah montirani na pozitivno nabijena staklca (Menzel SuperFrost Plus ili Thermo Scientific Colorfrost Plus Slides). Rezovi su montirani na na in da su stvarane paralelne serije rezova ozna ene slovima od a-f, kako bi se isti mozak mogao koristiti za 6 razli itih pokusa. Potom su staklaca sa rezovima spremljena u adekvatno ozna ene kutije koje su odloflene u zamrziva na -20 °C.

#### **4.8.2. Bojenje presjeka mišjeg mozga prema Nisslu (krezil violet)**

Svrha bojenja prema Nisslu bio je prikaz i procjene veli ine ishemijske lezije 1 i 4 dana nakon MCAO. Rezovi su najprije dodatno fiksirani na stakalca uranjanjem u 100% metanol 10 minuta, a potom je uslijedila rehidracija rezova; uronjeni su redomu: 95% etanol 15 minuta, 70% etanol 2 minute, 50% etanol 2 minute, destilirana voda 2 minute, ponovno destilirana voda 2 minute. Potom je uslijedilo bojenje prema Nisslu, uranjanjem stakalaca s rezovima na 6 minuta u otopinu koja je sadrflavala boju krezil violet (Sastav: 1,25 g krezil violet acetata i 0,75 ml ledene octene kiseline dodaje se u 250 ml tople destilirane vode. Otopina se promije-a, ohladi i filtrira.). Nakon bojenja uslijedilo je ispiranje i dehidracija rezova uranjanjem redom u: destiliranu vodu 2 minute, 50% etanol 2 minute, 70% zakiseljeni etanol (sastav: 2 ml ledene octene kiseline u 200 ml 70% etanola) 1 minuta, 95% etanol 2 minute, 95% etanol nekoliko puta umo ena stakalca sa rezovima, 100% etanol 2 minute. Prosvjetljavanje je provedeno sa ksilenom uranjanjem stakalaca sa rezovima 2 puta po 3 minute. Uslijedilo je poklapanje preparata mje-avinom dibutil-ftalata (plastifikator), polistriena i ksilena (*engl. Dibutylphthalate, Polystirene, Xylene ó DPX*). Staklaca s rezovima su ostavljena preko no i u ventiliranoj laboratorijskoj komori, digestoru, kako bi medij za pokrivanje DPX polimerizirao i o vrsnuo. Sljede i dan se vi-ak o vrsnutog medija za pokrivanje odstranio skalpelom, a stakalca s rezovima su odloflena u obiljeffene kutije uvane na sobnoj temperaturi.

#### **4.8.3. Imunohistokemija**

Za prikaz izraflaja GAP43 na stani noj razini koristila se metoda indirektna imunohistokemije fluorescentnim protutijelima. Analiza je provedena na transgeni nim mi- evima s unesenom

sekvencom GAP43-luc/gfp, u vremenskim to kama 1 i 4 dana nakon izazivanja ishemijske ozljede mozga, te na kontrolnim mi- evima s unesenom sekvencom GAP43-luc/gfp, koji su lafno operirani bez ishemijske ozljede mozga. Uzorci su obilježavani protutijelima za 6 razli itih stani nih biljega; protutijelom specifi nim za zeleni fluorescentni protein, GFP (*engl. green fluorescent protein*), GAP 43 (*engl. growth associated protein*), cijepanu kaspazu-3, CASP3 (od *engl. cleaved caspase-3*), faktor aktivacije transkripcije, ATF-3 (*engl. activation transcription factor*), biljeg astrocita, GFAP (*engl. glial fibrillary acidic protein*), biljeg jezgara neurona, NeuN (od *engl. neuronal nuclei*). Kori-tena protutijela prikazana su u Tablici 2. Analiza je provedena kori-tenjem dvaju protutijela istodobno kako bismo prikazali kolokalizaciju (prisustvo dva antigena u istoj stanici).

Odabrana stakalca izvade se iz zamrziva a gdje su stajala pri -20°C i smjeste se u vakuumsku komoru 2 sata na sobnoj temperaturi kako bi tkivo im bolje prionulo uz stakalca. Stakalca se zatim ispiru 3 puta po 5 minuta s otopinom 0,2% Tritona X-100 u fosfatnom puferu (PBS od *engl. phosphate buffer saline*, sastava 13,7 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,65 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,4, +4°C) kako bi se odstranio vi-ak teku ine za uklapanje. Triton X-100 koristi se za pobolj-anje prodiranja protutijela u stanice. Kako bi se prije ilo nespecifi no vezanje protutijela uzorci se inkubiraju 60 minuta u 10% kozjem serumu u PBS-u uz dodatak 0,2% Tritona X-100 Kako bi se smanjio volumen kori-tenih protutijela na stakalcima se prezezi zaokruffle masnom olovkom koja sprje ava izlivanje teku ine izvan nacrtanog okvira (Dako Pen, Dako S2002 ). Uzorci se inkubiraju primarnim protutijelima koja se specifi no veflu za antigene od interesa (Tablica 8.), uz dodatak 2% kozjeg seruma u PBS-u preko no i na +4°C. Ukupni volumen protutijela u otopini koji je kori-ten po svakom stakalcu je 250 l.

**Tablica 8.** *Popis primarnih protutijela korištenih u postupku indirektno imunohistokemije fluorescentno obilježenim protutijelima.*

Protutijelo	Podrijetlo	Monoklonsko/ poliklonsko	Razrjeđenje	Proizvođač	Kataloški broj
Anti-ATF-3	kuni	poliklonsko	1:200	Santa Cruz	SC-22798
Anti-ccasp-3	kuni	poliklonsko	1:250	Cell Signaling	9661S
Anti-GAP-43	mi-	monoklonsko	1:125	Sigma-Aldrich	G-9264
Anti-GFP	kuni	poliklonsko	1:250	Millipore	AB3080
Anti-GFP	pile	poliklonsko	1:500	Aves Labs	GFP-1020
Anti-GFAP	pile	poliklonsko	1:1000	Abcam	ab4674
Anti-NeuN	mi-	monoklonsko	1:250	Millipore	MAB377



Sljedeći dan stakalca su se ispirala 5 puta po 5 minuta u PBS-u uz dodatak 0.2% Tritona X-100 te su se potom inkubirala u odgovarajućim sekundarnim protutijelima koja se specifično vežu za primarna protutijela flivotinja u kojima su generirana (Tablica 9) 2 sata pri sobnoj temperaturi u mraku. Stakalca se ispiru 5 puta po 5 minuta u PBS-u uz dodatak 0,2% Tritona X100, a zatim 2 puta po 1 minutu u PBS-u. Naposljetku se uzorci prekrivaju sredstvom za obojavanje fluorescencije (Fluorescence Mounting Medium, Dako S3023) i pokrovnicom.

**Tablica 9.** Popis sekundarnih protutijela korištenih u postupku indirektno imunohistokemije fluorescentno obilježenim protutijelima.

Protutijelo	Podrijetlo	Vrsta antigena	Razrjeđenje	Proizvođač	Kataloški broj
Alexa Fluor 488	koza	mi-	1:600	Invitrogen	A11029
Alexa Fluor 488	koza	kuni	1:600	Invitrogen	A11034
Alexa Fluor 546	koza	kuni	1:600	Invitrogen	A11010
Alexa Fluor 546	koza	mi-	1:600	Invitrogen	A11003
Alexa Fluor 546	koza	pile	1:600	Invitrogen	A11040

Za prikaz krvnih žila i aksonogeneze u ipsi- i kontralateralnoj moždanoj kori korišteni su rezovi Thy1Tlr2<sup>-/-</sup> i Thy1 mi-eva, od kojih je 4 mi-a po genotipu tretirano s MCAO, dok su po 3 flivotinje po genotipu predstavljale lažne kontrole.

Obzirom da Thy1 transgeni mi-evi konstitutivno izražavaju flutu fluorescentnu bjelančevinu (*engl. Yellow fluorescent protein, YFP*) i to u dovoljnoj mjeri za njezinu vizualizaciju bez potrebe za protutijelima, rezovi su tretirani samo lektinom iz rajice za obilježavanje krvnih žila.

Odabrana stakalca izvadila su se iz zamrzivača gdje su obojena na -20°C i smjestila su se u vakuumsku komoru 2 sata na sobnoj temperaturi kako bi tkivo bolje prionulo uz stakalca. Stakalca su se zatim ispirala 3 puta po 5 minuta s otopinom 0.2% Tritona X-100 u fosfatnom puferu.

Kako bi se spriječila nespecifična vezanja protutijela uzorci su se inkubirali 60 minuta u 10% kozjem serumu u PBS-u uz dodatak 0,2% Tritona X-100.

Kako bi se smanjio volumen korištenih protutijela na stakalcima se prerezi zaokružile masnom olovkom koja sprječava izlijevanje tekućine izvan nacrtanog okvira (Dako Pen, Dako S2002).

Uzorci su se inkubirali s fluorescentno obilježenim lektinom iz rajice, DyLight 594 labeled Lycopersicon Esculentum (Tomato) Lectin (LEL, TL, Vector Labs, katalog broj DL-1177) 1 mg/ml u razrjeenju 1/200 koji se veće za endotelne stanice i stanice mikroglije. Navedene strukture je lako razlikovati obzirom na specifičan valjkasti i razgranat oblik krvnih žila, odnosno sitnije i zasebne pojedinačne stanice mikroglije.

Nakon trostrukog ispiranja, dodan je reagens za prikaz stanih jezgara 4',6-diamidino-2-fenilindol laktat (DAPI) u razrjeenju 1/10<sup>6</sup>. U destiliranoj vodi. Ta je otopina s rezova ispirana 2 puta nakon čega je uslijedilo pokrivanje sredstvom za obovanje fluorescencije i pokrovnicom.

#### **4.8.4. Kvalitativna analiza uzoraka**

Kvalitativna analiza uzoraka obilježenih fluorescentnim protutijelima u injena je fluorescencijskim mikroskopom Zeiss Axiovert 200, te konfokalnim mikroskopom Zeiss, LSM 510-META a fotografije su napravljene digitalnom kamerom AxioCam Zeiss u programu AxioVision LE. Fotografije su kasnije obrađene (promjena osvjetljenja, kontrasta i stapanje (*engl. merge*) u programu ImageJ.

Kvantifikacija fluorescentnog signala za CASP3, GAP43, lektin i YFP je provedena tako da je najprije fotografirano po 5 nasumičnih vidnih polja u području kore oko ishemijske lezije na ipsilateralnoj strani i 5 odgovarajućih polja na kontralateralnoj strani (kontrola imunofluorescentnog označavanja). Analizirano je deset rezova montiranih na stakalce nakon rezanja na kriostatu (svaki 6 presjek se nalazio na predmetnom stakalcu).

Intenzitet signala je procijenjen pomoću programa Fiji kojim se mjerila integrirana optička gustoća signala, što odražava vrijednost intenziteta fluorescencije po jedinici površine. Vrijednost mjerenja je izražena u arbitrarnim jedinicama (167).

Za mjerenje parametara krvnih žila sastavljena su 2 makro programska slijeda za obradu u Fiji-u te su njima određeni promjeri krvnih žila, broj dodira s okomitom rešetkom, površina slike koju prekrivaju žile, dok je broj različitih određenih od strane zaslijepljenog ispitivača (Slike 14., 15., 16.).

```

macro "segmentation of blood vessels, DG" {
rename("IMAGE00x.Tif");
run("Invert");
run("Duplicate...", "title=IMAGE00x-1.Tif");
run("8-bit");
run("Max...", "value=250");
run("Convert to Mask");
run("Gaussian Blur...", "sigma=3");
run("Make Binary");
run("Erode");
rename("temp");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Outlines display
summarize");}

```

**Slika 14.** Programski slijed (engl. macro) za segmentaciju krvnih žila u Fiji programu.

```

macro "new segmentation DG" {
rename("IMAGE00x.Tif");
run("Invert");
run("Duplicate...", "title=IMAGE00x-1.Tif");
run("8-bit");
run("Max...", "value=250");
run("Convert to Mask");
run("Gaussian Blur...", "sigma=3");
run("Make Binary");
run("Erode");
run("Invert");
run("Divide...", "value=255.000");
setMinAndMax(0, 1);
rename("temp");

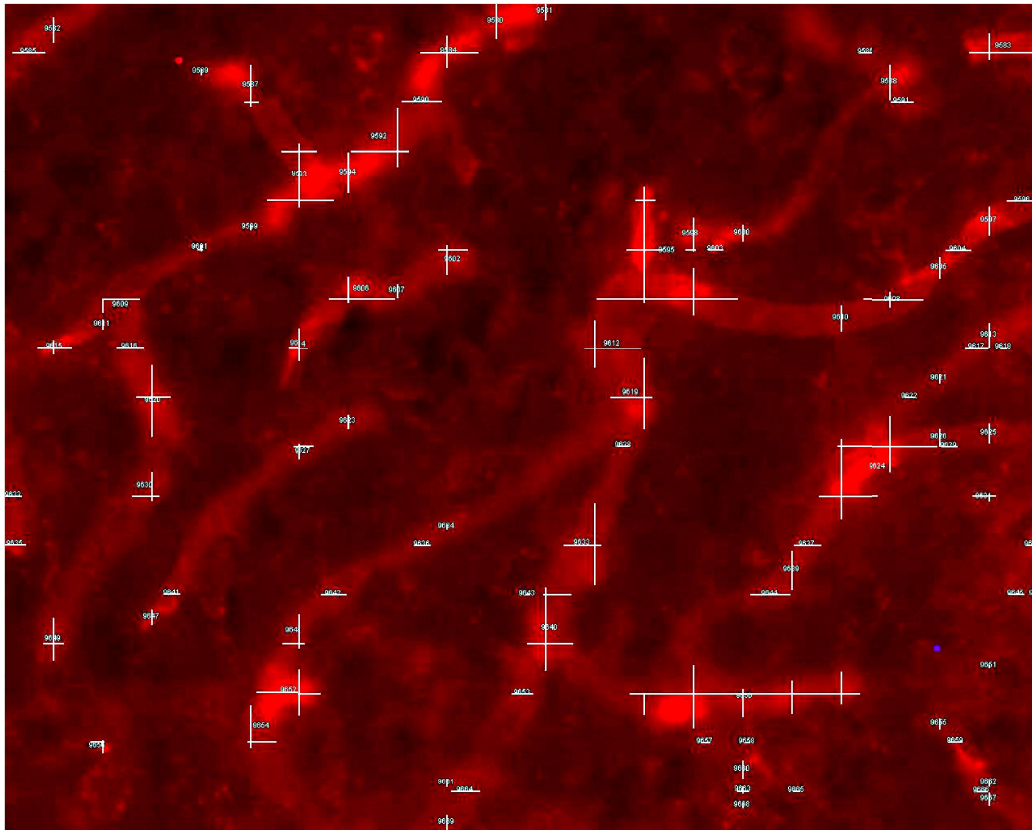
newImage("grid", "8-bit White", 1280, 1024, 1);
selectWindow("grid");
color = "black";
nLines = 20;
width = getWidth();
height = getHeight();
tileWidth = width/(nLines+1);
tileHeight = tileWidth;
xoff=tileWidth;
while (xoff<width) { // draw vertical lines
makeLine(xoff, 0, xoff, height);
run("Fill", "slice");
run("Add Selection...", "stroke="+color);
xoff += tileWidth;
}
yoff=tileHeight;
while (yoff<height) { // draw horizontal lines

makeLine(0, yoff, width, yoff);
run("Fill", "slice");
run("Add Selection...", "stroke="+color);
yoff += tileHeight;
}
run("Select None");
run("Divide...", "value=255.0000");
setMinAndMax(0, 1);

imageCalculator("Add create", "temp", "grid");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
setThreshold(0, 0);
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Outlines
summarize");
imageCalculator("AND create", "IMAGE00x.Tif", "Drawing of Result of temp");

```

**Slika 15.** Programski slijed (engl. macro) za određivanje broja dodira krvnih žila i okomite rešetke



**Slika 16.** Rezultat međukoraka za makro u programu Fiji koji broji dodire s okomitom rešetkom. Crveno su obojene krvne žile, dok su bijelo predstavljene presjeci s okomitom rešetkom. Njihov broj je mjerilo izvijuganosti i time posredni pokazatelj vaskularnog remodeliranja.

#### 4.9. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze s korakom obrnutog prepisivanja (qRT-PCR)

##### 4.9.1. Izolacija RNA

fiivotinje su firtvovane prije MCAO (za vremensku to ku 0 h), 72 sata, tjedan dana i mjesec dana nakon MCAO (po 3 mi-a za skupinu divljeg tipa te 3 za skupinu Tlr2-/- mi-eva). Mozgovi su izva eni nakon usmr ivanja cervikalnom dislokacijom te su odvojene hemisfere koje su potom naglo smrznute u teku em du-iku te su se uzorci uvali na -80°C.

Uzorci RNA su pripremljeni iz svake pojedine hemisfere koriste i TRI REAGENT® (Molecular Reasearch, Center, Inc. Cincinnati, OH, USA). U epruvete od 13 ml stavljeno je 1 mL trizola i sve je drflano na ledu. U svaku epruvetu s trizolom stavljen je uzorak tkiva (50-100 mg). Tkivo je jednoli no usitnjeno homogenizatorom u trajanju od 3 minute i potom stavljen na led. Nakon svakog uzorka homogenizator je ispran u vodovodnoj vodi, potom je o i- en otopinom za dekontaminaciju RNAza (RNaseZap® RNase Decontamination

Solution, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, US), obrisan papirom te je uronjen u 70% etilni alkohol, destiliranu vodu i na kraju u reagent za izolaciju RNA (TRI REAGENT®).

Homogenizirani sadržaj premješten je u epruvetice od 1,5 mL. U svaku epruveticu dodano je 0,2 mL kloroforma te je dobro promiješano (protreseno). Nakon toga epruvetice su stavljene na centrifugiranje pri 12 000 g / 15 min na 4°C kako bi se odvojile faze. Tijekom centrifugiranja u iste epruvetice stavljeno je 0,5 mL izopropanola, na koji je stavljena vodena faza iz prethodno centrifugiranih epruvetica. Epruvetice s izopropanolom stavljene su na 15 minuta u duboko smrzavanje (-20°C). Nakon toga epruvetice su stavljene na centrifugiranje pri 12 000 g / 15 min na 4°C. Nakon centrifugiranja teku i sadržaj izlije se u epruvetice, a epruvetice se okrenu na papir kako bi se tekućine ocijedilo (osušilo). Na dnu epruvetice, često se vidi bijeli talog u obliku crtice (RNA).

U sljedećem koraku u epruvetice je stavljeno 1 mL 75% etilnog alkohola (koji je napravljen s vodom tretiranom dietilpirokarbonatom, *engl. Diethylpyrocarbonate*, DEPC) te su epruvetice stavljene na centrifugiranje pri 8 000 g / 6 min na 4°C. Nakon centrifugiranja alkohol se izlije, a epruvetice se malo duže osuše na papiru kako bi tekućina alkohola isparilo. Nakon toga u epruvetice dodano je 60 µL vode tretirane DEPC-om. Sadržaj u epruveticama lagano je protresen prstom te su epruvetice stavljene na uparavanje kroz 2 minute kako bi preostali alkohol u potpunosti ispario. Nakon uparavanja na uređaju NanoDrop 2000c Spectrophotometer (ThermoScientific) je dobivena izračunata koncentracija RNA u jedinicama µg/µL.

#### 4.9.2. Prepisivanje u cDNA

Dobivena RNA je prepisana u cDNA pomoću pribora TaqMan® High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) s popisom gena u Tablica 10.

Komercijalni kit se sastojao od 2x pufer za reverznu transkripciju (*engl. RT Buffer*) i 20x smjesa enzima (*engl. Enzyme Mix*). Redoslijed nanošenja u 0,2 mL epruvetice bio je:

- I. DEPC H<sub>2</sub>O
- II. Kombinacija (pufer za reverznu transkripciju i smjesa enzima) 611 µL
- III. RNA (do ukupne količine od 20 µL)

Epruvetice su lagano protresene prstom te se provelo kratkotrajno centrifugiranje za spuštanje taloga. Epruvetice su stavljene u uređaj za lančanu reakciju polimerazom (Eppendorf Mastercycler) u trajanju od 1h i 5 minuta.

**Tablica 10.** Popis testova izražaja gena na razini mRNA u komercijalno dostupnom priboru TaqMan® High Capacity RNA-to-cDNA Kit.

TaqMan® testovi izražaja gena na razini mRNA		Identifikacijska oznaka testa
Tlr2	receptor nalik na Toll 2	Mm00442346_m1
MyD88	mijeloidni imbenik diferencijacije 88	Mm00440338_m1
Irak1	kinaza-1 povezana s receptorom za interleukin 1	Mm00434254_m1
Irak4	kinaza-4 povezana s receptorom za interleukin 1	Mm00459443_m1
Ikkkb	inhibitor B kinaze	Mm01222247_m1
Irak3	kinaza-3 povezana s receptorom za interleukin	Mm00518541_m1
Tollip	bjelan evina koja me udjeluje s receptorom nalik na Toll	Mm00445841_m1
Nfkbia	inhibitor -poja iva a gena Nf B	Mm00477798_m1
Nfkb1	poja iva gena nuklearnog imbenika laganog polipeptida B-limfocita, p105	Mm00476361_m1
Tnf	imbenik nekroze tumora-	Mm99999068_m1
Il6	interleukin 6	Mm00446190_m1
Il1b	interleukin 1b	Mm01336189_m1
Casp1	kaspaza 1	Mm00438023_m1
Casp8	kaspaza 8	Mm00802247_m1
Fadd	Fas (TNFRSF6) povezan putem domene usmr ivanja	Mm00438861_m1

#### 4.9.3. Kvantitativna reakcija lančane reakcije polimerazom

Izraflaj mRNA je analiziran pomo u kvantitativnog PCR-a s korakom reverzne transkripcije u stvarnom vremenu (*engl. Quantitative Real-time Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction, qRT-PCR*) koriste i TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) (Tablica 10.).

Svi su geni navedeni prema slufbenim simbolima Nacionalnog centra za biotehno-ke informacije (*engl. National Center for Biotechnology Information, NCBI*).

Reakcije PCR-a su provedene u triplikatu sa 100 ng cDNA u volumenu reakcijske smjese od 20 l.

Prema uputama proizvo a a za jedan uzorak nanosilo se:

1. 9 µL otopine cDNA (1 µL cDNA + 8 µL DEPC H<sub>2</sub>O)
2. 1 µL TaqMan® probe
3. 10 µL TaqMan® glavne smjese

Ispitivani uzorci, prema uputama proizvo a a nanijeti su u 96-well plo e (FG-TCII Reaction Plt-96 Well, 4306737, Invitrogen) u ukupnoj koli ini od 20 µL, a svaki uzorak napravljen je u

triplikatu. RT-PCR izveden je pomoću uređaja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, US) u 40 ciklusa.

Relativna kvantifikacija je procijenjena na temelju formule  $2^{-\Delta Ct}$  te normalizacijom količine ciljanog gena u odnosu na gen održavanja stanice  $\beta$ -aktin (engl. *Actin- $\beta$ , Actb*).

## **4.10. Western Blot**

### **4.10.1. Izolacija bjelančevina**

#### **4.10.1.1. Žrtvovanje životinja za izolaciju bjelančevina**

Životinje su žrtvovane u vremenskim točkama 0 (kontrola), 3, 7, 14 i 28 dana nakon MCAO. Eutanizirane su cervikalnom dislokacijom te je iz lubanje izoliran mozak. Odijeljeni su komadi i ipsilateralne i kontralateralne moždane kore u zasebne epruvetice od 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) te su naglo smrznuti u tekućem dušiku i sačuvani na temperaturi od  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.10.1.2. Homogenizacija bjelančevina**

Bjelančevine su izolirane iz prikupljenih uzoraka metodom mehaničke homogenizacije u SUB puferu (700 mikrolitara po uzorku: 5% SDS, 8M urea, 2% beta-merkaptoetanol) s dodatkom inhibitora proteinaza (Proteinase inhibitor, complete<sup>®</sup>, Roche, Basel, Švicarska). Svi postupci odvijali su se na ledu, kako bi se spriječila degradacija bjelančevina.

Njihova koncentracija utvrđena je spektrofotometrijski u odnosu na slijed BSA rastuće koncentracije (0, 0,5  $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{L}$ , 1,5  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$ , 2,5  $\mu\text{L}$ ) za određivanje krivulje odnosa absorbancije i koncentracije.

### **4.10.2. Elektroforeza bjelančevina u gelu**

Za elektroforezu se koristio BioRad Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3 sustav (Biorad<sup>®</sup>, Hercules, CA, US) s kojim ima za pravljenje 15 jaflica i izvorom električnog napona BioRad PowerPac<sup>®</sup> Power Supply (Biorad<sup>®</sup>, Hercules, Kalifornija, USA). Debljina prostora za lijevanje gela bila je 1,5 mm.

Obzirom na veličinu bjelančevina od interesa (od DLG4 = 95 kD do CASP3= 33 kD) odabran je gel gustoće 12%.

18 mL gela za elektroforezu (za 2 sustava) sadrži 5,40 mL 40% otopine akrilamid-bis-akrilamida, 7,83 mL sterilne vode, 4,5 mL 1,5M Tris-HCl (pH 8,5), 180  $\mu\text{L}$  10% SDS-a, 90  $\mu\text{L}$  10% APS-a (amonijev persulfat) te 9  $\mu\text{L}$  TEMED-a.

Nakon očišćenja gela za elektroforezu, na njegovu se površinu nanosi standardni gel za stvaranje fronte bjelančevina. 3 mL takvog gela se sastoji od 0,30 mL 40% otopine akrilamid-

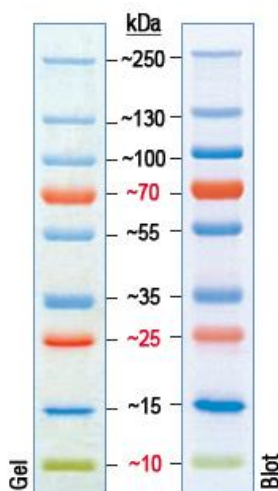
bis-akrilamida, 1,91 mL sterilne vode, 0,75 mL 0,5 M Tris-HCl-a (pH 6,8), 30 $\mu$ L 10% SDS-a, 15  $\mu$ L 10% APS-a i 6  $\mu$ L TEMED-a.

U njega se stavlja e-lji za jaflice koje se formiraju solidifikacijom gela i uklanjanjem e-lji a.

Uzorci su se nanosili u jaflice u koli ini od 15  $\mu$ g te proporcionalnom koli inom 4X pufera za punjenje bjelan evina.

40 mL 4x pufera za punjenje bjelan evina sastoji se od malo bromofenol plavog, 16 g SDS-a, 4,8 mL beta-merkaptoetanol, 8mL glicerola, 8 mL 0,5M Tris-a (pH 6,8) i preostali volumen ini sterilna voda. Uzorke je potrebno prokuhati 5 minuta na 95•C s 4x puferom kako bi se bolje profleli.

U jednu od jaffica nanesena je kontrolna mje-avina unaprijed obojenih bjelan evina poznate veli ine Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific™, Waltham, MA, US) (Slika 17.)



**Slika 17.** PageRuler™ standard s obojenim bjelančevinama poznate veličine za praćenje migracije bjelančevina u električnom polju kroz gel.

1 litra 10x pufer za elektroforezu u gelu sadrflavala je 29g Tris-baze, 144 g glicina, 10 g SDS-a i ostatak volumena nadopunjen je destiliranom vodom.

Za dobivanje 1x pufera za elektroforezu, 10x pufer se razrje uje s vodom u omjeru 1/10.

Bjelan evine su migrirale u elektri nom polju pod naponom od 100 Volti.

#### 4.10.3. Transfer bjelančevina s gela na membranu

PVDF (poliviniliden florid) membrana (Immun-Blot®, BioRad, Hercules, California, USA) je pripremljena kratkotrajnim natapanjem (1 minuta) u metanolu.

Gelovi su potom smje-teni u sendvi izme u 2 Whatman® celulozna filter papira (Whatman® 3MM papers, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MI, US) u kupki ispunjenoj puferom



za transfer. Sendvič je obuhvaćen spuflavicama te je smješten u pufer za pažljivo izbjegavanje i zarobljene mjehuriće zraka.

1 litra 10x pufera za transfer na membranu sadržavala je 30 g Tris-baze i 145 g glicina. Za dobivanje 1x pufera za transfer, 10x pufer se razrjeđuje s vodom i metanolom u omjeru 1/7/2.

Transfer se odvijao u električnom polju napona 75 Volti u trajanju od 1,5 h.

Sustav je bio okružen ledom radi održavanja stalne temperature koja bi u suprotnom rasla i utjecala na bjelanjčevine. Također, rotirajući i magnet u podnožju sustava omogućavao je stalno protjecanje tekućine i tako je spriječeno lokalno zagrijavanje.

Kiselim Ponceau bojenjem provjerena je uspješnost prijenosa bjelanjčina na PVDF membranu. To omogućuje rezanje membrane ne to nifto od mjesta gdje se prema standardu procjenjuje da je prenesen beta-tubulin (50 kD). Takva 2 dijela membrane mogu se koristiti za zasebno ispitivanje višestrukih bjelanjčina.

#### 4.10.4. Obilježavanje primarnim protutijelima

Kako bi se blokirala izložena mjesta i spriječila nespecifično vezanje protutijela pojedini dijelovi membrana su potom inkubirani 1 sat na sobnoj temperaturi u 5% nemasnom mlijeku u prahu u PBS-Tween puferu.

Gornji dijelovi membrana su inkubirani s primarnim protutijelima na DLG4 (95kD) i  $\beta$ -tubulin (50 kD), dok su donji dijelovi inkubirani s primarnim protutijelima na GAP43 (43 kD), sinaptofizin (46 kD) i CASP3 (33 kD) prema tablici 11.

**Tablica 11.** Protutijela s veličinom bjelanjčevine koju obilježavaju i pripadajućim razrjeđenjem korištenim u pokusu. Navedeni su proizvođači i kataloški brojevi.

Protutijelo	Veličina (kD)	Izvor podrijetla	Razrjeđenje	Proizvođač	Kataloški broj
DLG4(PSD95) (D27E11) XP®	95	kuni	1/10,000	CellSignaling	3450S
$\beta$ -tubulin	55	kuni	1/60,000	CellSignaling	5568S
GAP43	43	miš	1/10,000	Sigma-Aldrich®	
Sinaptofizin, (Synaptophysin, clone SY38)	38	miš	1/10,000	Millipore	MAB5258-50UG
CASP3	32	kuni	1/10000	Abcam	ab32351

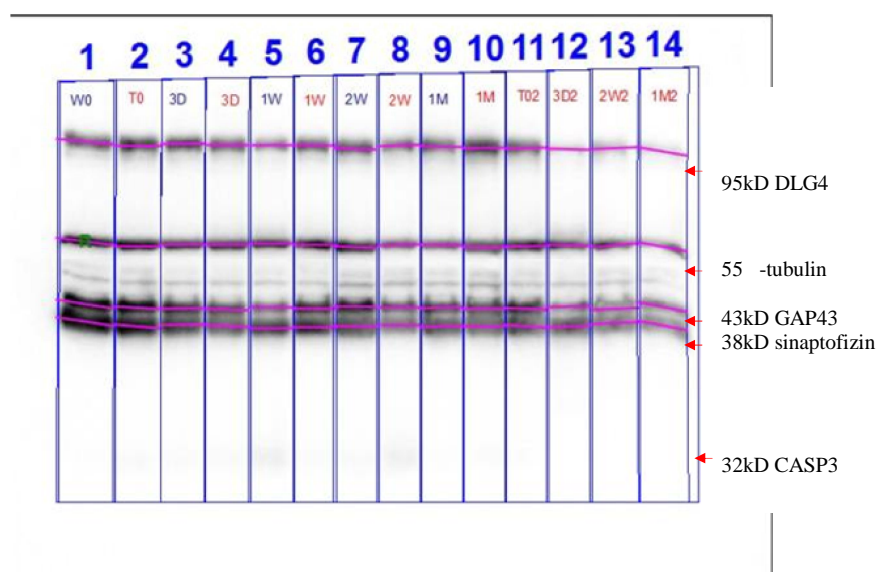
Nakon inkubacije primarnim protutijelom preko noći na temperaturi od 4°C, membrane se ispiru 4 puta s PBS-Tween puferom u padajućim koncentracijama mlijeka u prahu.

#### 4.10.5. Obilježavanje sekundarnim protutijelima

Membrane je potrebno inkubirati sa sekundarnim protutijelima koja prepoznaju primarna, a to su protutijelo na mi-a proizvedeno u kozi (Thermo Fisher Scientific 32430) i protutijelo na zeca proizvedeno u kozi (Thermo Fisher Scientific A27011), oba u razrje enju od 1/20.000 u 5% mlijeku u prahu u PBS-u. Pufer s protutijelima se potom mođe sa uvati za daljnje inkubacije, a same membrane se nakon inkubacije ispiru 4 puta PBS-Tween puferom.

#### 4.10.6. Prikaz signala kemiluminiscencijom

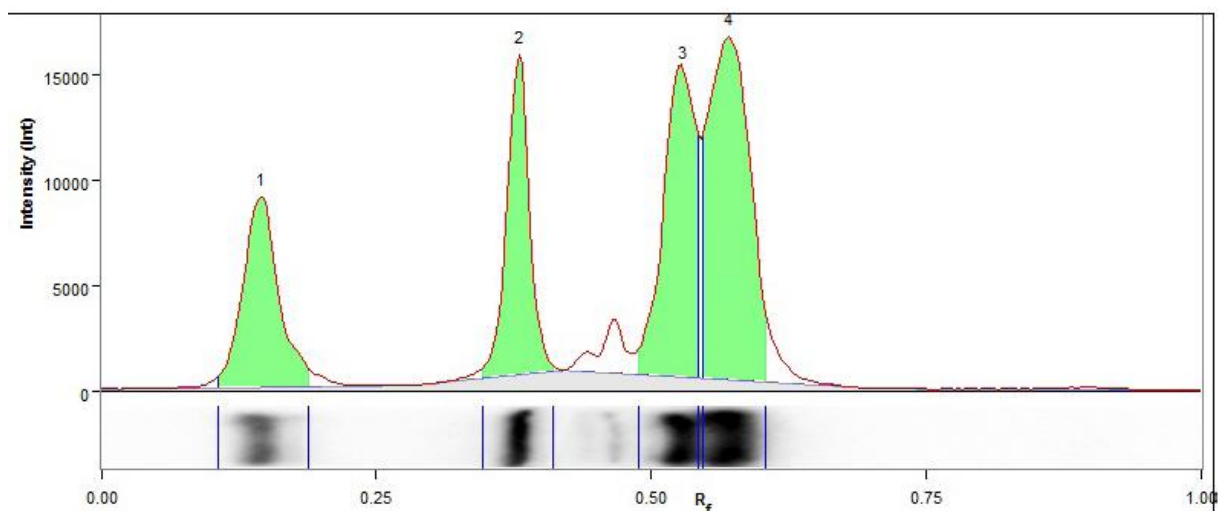
Prikazivanje signala omogu uje kemiluminiscencija koja nastupa uslijed reakcije protutijela i reagensa (Western Lightning ó ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate, PerkinElmer, Waltham, MA, US). Signal se o itava na sustavu ChemiDocÍ MP System (Biorad®, Hercules, CA, US) i analizira pomo u softvera Image LabÍ Software (Slika 19.,20.).



**Slika 18.** Primjer analize membrane kemiluminiscencijom pomoću softvera Image Lab™ Software, BioRad, USA. Crno su naznačeni divlji tipovi C57Bl/6 po vremenskim točkama od 0, 3D, 2W i 1M koji označavaju kontrolu, 3 dana, 2 tjedna i mjesec dana nakon MCAO, navedenim redom. Crveno su naznačeni uzorci Tlr2-/- koji odgovaraju navedenim kontrolama. Tragovi su na 95kD DLG4, 55 kD za  $\beta$ -tubulin, 43kD za GAP43 i 38kD za sinaptofizin. Signal CASP3 (32 kD) se tek nazire i postaje jasniji nakon dulje ekspozicije.

## Lane And Band Analysis

### Lane 1



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,147	7.116.628	N/A	0,95	17,8	16,4
2		N/A	0,381	7.505.913	N/A	1,00	18,8	17,3
3		N/A	0,531	10.338.074	N/A	1,38	25,9	23,8
4		N/A	0,572	14.957.607	N/A	1,99	37,5	34,4

Band Detection	Automatically detected bands with sensitivity: Low
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

**Slika 19.** Primjer analize pojedinih vrpca bjelančevina na membrani nakon snimanja u uređaju ChemiDoc™ XRS Gel Documentation systems (US). Image Lab™ Software omogućuje prilagodbu širine vrpce za procjenu intenziteta i veličine signala kemiluminiscencije iz čega se posredno zaključuje o količini bjelančevine prisutne u uzorku. Na apscisi se nalazi udaljenost koju su bjelančevine premašile migrirajući kroz gel, dok je na ordinati intenzitet signala.

*Engl. Lane And Band Analysis- analiza stupaca i vrpca. Band No.- Broj vrpce; Band Label- Oznaka vrpce; Mol.Wt.(Molecular Weight)-molekularna težina; Relative front-relativna granica; Volume-volumen; Abs.Quant. (Absolute Quantity) - apsolutna količina; Rel.Quant. - relativna količina; Band – Vrpca; Lane - stupac; Band Detection- detekcija vrpca; Automatically detected bands with sensitivity:Low – automatski detektirane vrpce s osjetljivošću:nisko; Lane Background-Pozadina stupca; Lane background subtracted with disk size: 10 –signal pozadine koji se oduzima pomoću veličine diska:10 piksela; Intensity-intenzitet.*

#### 4.11. *In vivo* snimanje bioluminiscencije

##### 4.11.1. Linija miševa za snimanje bioluminiscencije

Za selektivno prikazivanje neurona koji istovremeno izražavaju GAP43 i CASP3 u mozgu živih miševa 1 i 4 dana nakon ishemijske lezije korištena je transgeni na mišja linija GAP-43/luc/gfp., koja pod promotorom za gen Gap43 sadrži dvostruki bicistronski reporterski sustav: luciferazu (luc) i zelenu fluorescentnu bjelanu (engl. green fluorescent protein, gfp) (162). Budući da crna boja mišjeg krzna (pigment melanin) apsorbira dio svjetlosnog spektra iznad 600 nm i raspršuje signal, krzno je uklonjeno električnim brijem aparatom sa područja lubanje, dok bi idealan uzorak predstavljala albino mišica istog genotipa.

##### 4.11.2. Supstrat za bioluminiscenciju

Uporabom natrijeve soli Z-DEVD aminoluciferina VivoGlo<sup>®</sup> Caspase 3/7 (P1781, VivoGlo<sup>®</sup> Caspase-3/7 Substrate Z-DEVD-Aminoluciferin, Sodium Salt, Promega, Fitchburg, WI, US) omogućena je vizualizacija izražaja rekombinantnog gena (*Gap-43*) isključivo u stanicama koje su u procesu apoptotskog odumiranja i imaju aktivirane kaspaze. Z-DEVD-aminoluciferin topljivi je supstrat koji sadrži tetrapeptidnu DEVD sekvencu koju prepoznaju kaspaza-3 i kaspaza-7. Tetrapeptid DEVD veže se na aktiviranu kaspazu N-terminalno od aktivnog mjesta koja zatim odcepljuje DEVD peptid, a oslobođeni aminoluciferin reagira sa luciferazom i proizvodi mjerljivu svjetlost.

##### 4.11.3. Protokol bioluminiscencije

Oslikavanje *in vivo* provedeno je pomoću IVIS<sup>®</sup> Spectrum (Caliper Life Sciences, PerkinElmer company, Hopkinton, MA, US) sustava za detekciju bioluminiscencije prema protokolu koji su u svojem radu opisali Cordeau i Bohanek (Slika 21.) (120, 134).

Ukratko, 25 minuta prije samog snimanja miševima je intraperitonealno injiciran supstrat VivoGlo<sup>®</sup> Caspase 3/7 u volumenu 10  $\mu$ l/g tjelesne težine. Neposredno prije početka snimanja miševi su anestetizirani u indukcijskoj komori. Miševi su potom premješteni u IVIS<sup>®</sup> 200, gdje su položeni na grijanu podlogu u potrbušnom položaju, sa njima u otvoru kroz koji je dotjecao inhalacijski anestetik (2% izofluran u 100% kisiku, 1L/min). Mjerenje bioluminescentnog signala provedeno je pomoću CCD kamere visoke osjetljivosti i rezolucije kojom su zabilježene emitirane valne duljine između 300 i 660 nm. Vrijeme ekspozicije bilo je 2 minute, na području 4 x 4 cm, pomoću visokog stupnja zaprimanja informacija o rezoluciji, te visoke osjetljivosti (engl. *high binning*), uz aperturu leće f/1.



**Slika 20.** Shematski prikaz IVIS® Spectrum sustava za detekciju bioluminiscencije, preuzeto i prilagođeno prema priručniku za korištenje Perkin Elmer Life Sciences IVIS® Spectrum (168).

#### 4.11.4. Analiza signala bioluminiscencije

Emitirana bioluminiscencija normalizirana je i kvantificirana u jedinicama površinskog zračenja - fotoni/s/cm<sup>2</sup>/sr (ukupni broj fotona/sekundi/površina (cm<sup>2</sup>)/steridijanu). Područje interesa (*engl. region of interest, ROI*), u ovom slučaju 4 x 4 cm, korišteno je kako bi se ta vrijednost prerađivala i izrazila u obliku broj fotona/sekundi. Navedene vrijednosti izrađene su na način da su stvorene pseudo-obojene slike (crvena i plava su predstavljale najvišu vrijednost intenziteta), koje su potom superponirane crno-bijeloj fotografiji koja je snimljena neposredno prije mjerenja bioluminiscencije.

#### 4.12. Statistička obrada podataka

Preživljenje se analiziralo log-rank (Mantel-Coxovim) testom.

U usporedbi divljeg tipa (WT) kao kontrole i Tlr2<sup>-/-</sup> po vremenskim točkama (izražavajući bjelanjak, testovi ponavljanja, analiza krvnih žila i aksona) korišten je 2-strani ANOVA test za ponovljena mjerenja. Vrijednosti pojedinih skupina po vremenskim točkama uspoređivane su dvostranim T-testom. Radi višestrukih usporedbi korištena je Bonferronijeva korekcija za multiplicitet.

Prilikom označavanja razlika u rezultatima dobivenih kvantitativnim real-time RT-PCR-om, sve statistički značajne razlike su se označavale na grafovima pomoću \* oznake, no zato su usporedbe apsolutnih vrijednosti po vremenskim točkama za pojedini genotip prikazane odvojeno od usporedbi relativnih vrijednosti između genotipova.

Razina značajnosti na ostalim grafovima izrazila se za sve pojedine analize, a za razinu statistički značajne razlike uzimala se vrijednost od  $P \leq 0,05$ .

Oznake na grafovima bile su redom za  $P \leq 0,05$ ,  $P \leq 0,01$ , te  $P \leq 0,001$  kako slijedi: \*, \*\* i \*\*\* za razlike između skupina WT i Tlr2<sup>-/-</sup> tretirane s MCAO, odnosno +, ++, +++ za razlike između kontrolnih skupina WT i Tlr2<sup>-/-</sup> koje nisu tretirane s MCAO.

Za razlike između tretirane i netretirane skupine istog genotipa korištene su oznake #, ##, ### za WT, odnosno #, ##, ### za Tlr2<sup>-/-</sup>.

Za razlike između kontrola divljeg tipa i Tlr2<sup>-/-</sup> tretiranih s MCAO korištene su oznake i, ii, iii, odnosno i, ii, iii za razlike između kontrola Tlr2<sup>-/-</sup> životinja i WT tretiranih s MCAO (Tablica 12.)

**Tablica 12.** Označavanje statistički značajnih razlika između pojedinih skupina na grafovima s pojedinih vrijednostima i simbolima za usporedbe pojedinih skupina životinja.

Skupine u usporedbi	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.01$	$P \leq 0.001$
WT kontrola vs. WT MCAO	#	##	###
Tlr2 <sup>-/-</sup> kontrola vs. Tlr2 <sup>-/-</sup> MCAO	#	##	###
WT kontrola vs. Tlr2 kontrola	+	++	+++
WT kontrola vs. Tlr2 <sup>-/-</sup> MCAO	i	ii	iii
Tlr2 kontrola vs. WT MCAO	i	ii	iii
WT MCAO vs. Tlr2 <sup>-/-</sup> MCAO	*	**	***

## 5. REZULTATI

Cilj ovog rada bio je istrafiti utjecaj TLR2 kao posrednika uro enog upalnog odgovora na sinapti ku plasti nost i oporavak mi-eva nakon ishemijske ozljede.

Kako bi se to postiglo odre eni su specifi ni ciljevi pokusa kojima se trebalo odrediti razlike u funkcionalnom oporavku i reaktivnoj sinaptogenezi u mi-jem mozgu nakon MCAO izme u mi-eva divljeg tipa C57Bl/6 i mi-eva s onemogu enim Tlr2 genom (Tlr2<sup>-/-</sup>).

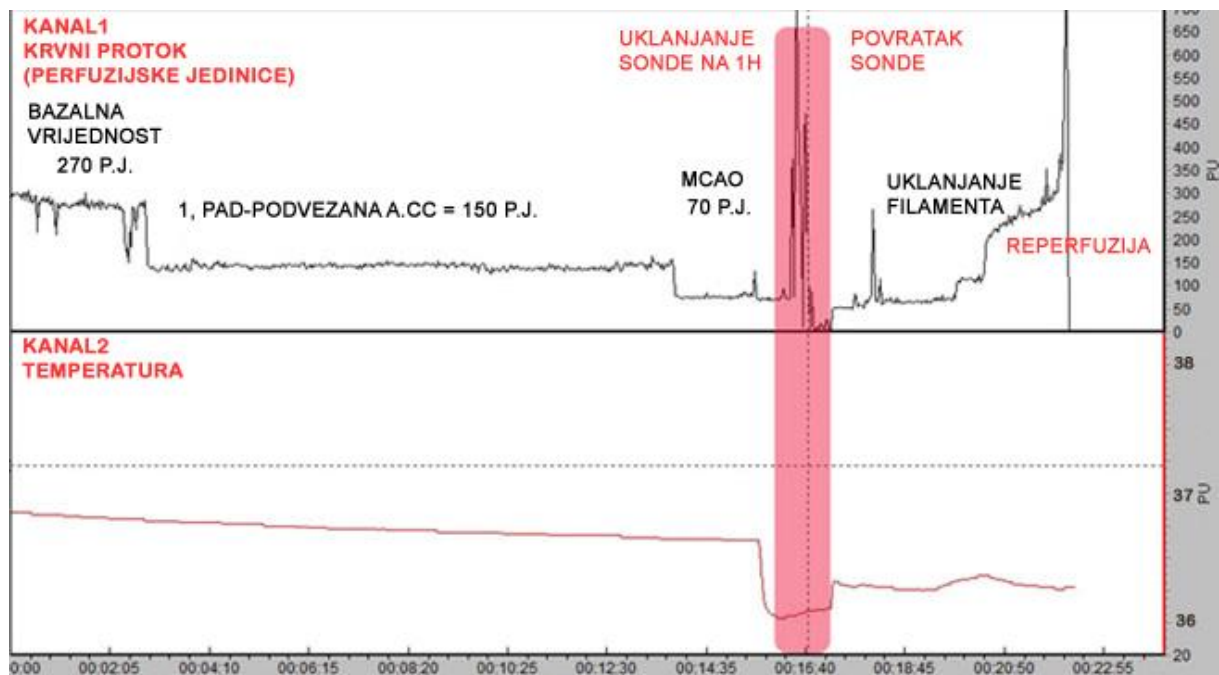
Model ishemijske koji se koristio u ovom radu zahtijevao je ujedna avanje veli ine lezije kod vi-e mi-eva, a koju provodi ista osoba, kako je obja-njeno u Uzorcima i postupcima (3.4.3. Izbjegavanje imbenika posredne povezanosti pri MCAO). Potom se pristupilo analizi funkcionalnog oporavka po vremenskim to kama te analizi izraflaja imbenika signalnog puta TLR2, sinaptogeneze, aksonogeneze i angiogeneze koje predstavljaju molekularnu i tkivnu osnovu o-te enja odnosno povrata ledirane funkcije.

### 5.1. Uspostava i standardizacija mišjeg modela ishemijskog oštećenja

#### 5.1.1. Mjerenje protoka na teritoriju MCA potvrđuje privremenu ishemijsku ozljedu mozga

Za kontrolu protoka i potvrdu njegovog zaustavljanja tijekom MCAO zahvata kori-ten je laserski doppler sustav sa sondom za male glodavce.

Po etni se protok kretao oko 500-550 jedinica, da bi se prilikom podvezivanja 1. vora dogodio pad za 30% (na otprilike 350 jedinica), a prilikom umetanja filameta je nastupilo daljnje smanjenje na 40% po etnog protoka (200-250 jedinica) (Slika 21.). Tijekom reperfuzije po etni protok se uspostavio kroz 20 do 30 sekundi. 4 flivotinje su isklju ene iz pokusa jer nije bilo promjena protoka nakon umetanja filameta, ni nakon opetovanog premje-tanja sonde. 3 su flivotinje isklju ene iz pokusa jer nakon 2 do 3 minute nije nastupila reperfuzija, ve je protok nastavio opadati. Tako se zahvaljuju i LDF-u moglo neizravno zaklju iti kako nastupilo subarahnoidalno krvarenje. To je kasnije potvr eno obdukcijским nalazom.



**Slika 21.** Kanal 1 prikazuje protok krvi mjereno sondom laserskog doplera prislonjenom uz sljepoočnu kost miša. Početni protok pada na 60% po podvezivanju a. carotis communis (a.CC), te potom na 40% prilikom umetanja filameta. Osjenčano područje označava razdoblje uklanjanja i povratka sonde na miša s vremenskim odmakom od sat vremena. Po uklanjanju filameta uočava se povrat protoka na 100% početnog. Kanal 2 prikazuje mjerenje temperature miša rektalnom sondom. Ona se održava unutar fizioloških vrijednosti grijanim podlogama. Korišteni program je moorVMS-PC V3-1 Vascular Monitor System (Moor Instruments, UK).

## 5.1.2. Metoda MCAO uzrokuje reproducibilno ishemijsko oštećenje mozga

### 5.1.2.1. Bojanje TTC-om prikazuje prisutnost ishemijskog oštećenja

Kako bi se dokazalo izazivanje lezije MCAO zahvatom, koristilo se bojanje TTC-om, krezil violetom te pra enje tjelesne tefline i preflivljenja operiranih flivotinja u pokusu.

Bojanje TTC-om je uobi ajeno bojanje za brzo i pouzdano prikazivanje hipoksi nog tkiva mozga te za odre ivanje veli ine ishemijskog podru ja i penumbre.

TTC se pomo u dehidrogenaza reducira u crveni formazan, poglavito u mitohondrijima flivu ih stanica. Intenzitet boje korelira s brojem i funkcionalnom aktivno– u mitohondrija (169). Pri tom navedena reakcija ne utje e na kvalitetu izolirane RNA i bjelan evina, –to omogu uje daljnje kori–tenje tkiva u pokusima kao –to je qRT-PCR i Western Blot (170). Obzirom da tijekom evolucije ishemijske lezije mozga dolazi do znatnih metaboli kih promjena, tim se bojanjem lako mofle precijeniti ili potcijeniti nekrotsko o–te enje tkiva (171). Stoga je njegova primjena ograni ena na kratke vremenske to ke gdje



je nekrotični nukleus živih stanica koje uklanjaju detritus ili pokušavaju stvarati glijalni ožiljak.

Bojanje TTC-om pokazalo je prisutnost ishemijske lezije na mozgovima miševa koji su potom korišćeni za RT-PCR i Western Blot postupak u akutnoj vremenskoj točki od 3 dana

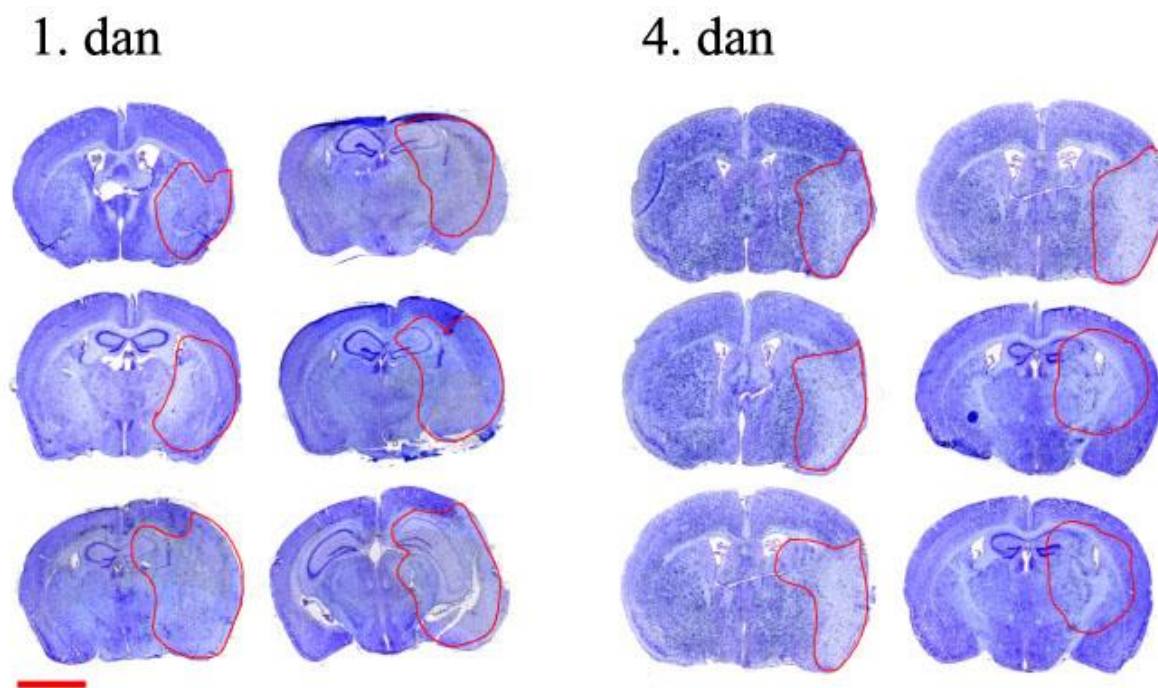


**Slika 22.** TTC in vitro bojanje koronarnih rezova debljine 2 mm 24h nakon MCAO snimljeno optičkim skenerom. Vitalno tkivo obojeno je crvenim produktom dehidrogenacije formazanom, dok je područje ishemijskog oštećenja ostalo neobojeno. Mjerilo 2 mm.

#### **5.1.2.2. Bojanje krezil violetom pokazuje ishemijsko oštećenje standardne veličine**

Bojanje krezil violetom služi za prikaz i izražavanje veličine ishemijskog oštećenja. Izražava se izravni volumen ishemijskog oštećenja. Izravni volumen ishemijskog oštećenja predstavlja volumen lezije vidljiv na histološkim preparatima kao tkivo ipsilateralne hemisfere koje nije uredne histološke građe (svjetlije, edematozno tkivo do 3 dana nakon MCAO) (Slika 24). Izravni volumen ishemijskog oštećenja izražava unat je tako da je površina lezije (u  $\text{mm}^2$ ) na svakom presjeku kroz mozak umnožena 6 puta te umnožena debljinom presjeka (35  $\mu\text{m}$ ). Ishemijska lezija nakon okluzije od 60 minuta obuhvaća korteks, hipokampus i striatum ipsilateralne hemisfere, dok se kontralateralna hemisfera prilikom bojanja krezil violetom može koristiti kao kontrola, obzirom da je jednolično obojena. Segmentaciju ishemijskog tkiva provodi ocjenjivač koji je slijep za genotipove (WT, Tlr2<sup>-/-</sup>) i tretman (laffno operirane miševine, miševine s MCAO).

Dobivena prosječna vrijednost volumena ishemijske lezije nakon 24 sata iznosila je  $102 \text{ mm}^3$  ( $\text{SD} = \pm 33 \text{ mm}^3$ ) čime je zadovoljen standard prosječne vrijednosti volumena ishemijske lezije između  $90\text{--}130 \text{ mm}^3$ , sa standardnom devijacijom  $< 40\%$  (172).



**Slika 23.** Bojanje po Nisslu krezil violetom za utvrđivanje ishemijskog oštećenja i standardizaciju MCAO postupka. Crvena demarkacija obuhvaća područje ishemijskog oštećenja (lezije), tkivo mozga koje nije uredne histološke građe u usporedbi s kontralateralnom hemisferom. 1. dan nakon ishemije, prisutan je neoštro ograničeni edem, dok je 4. dana nakon ishemije granica edematozne ishemijske lezije i zdravog tkiva jasnije izražena. Mjerilo 5 mm.

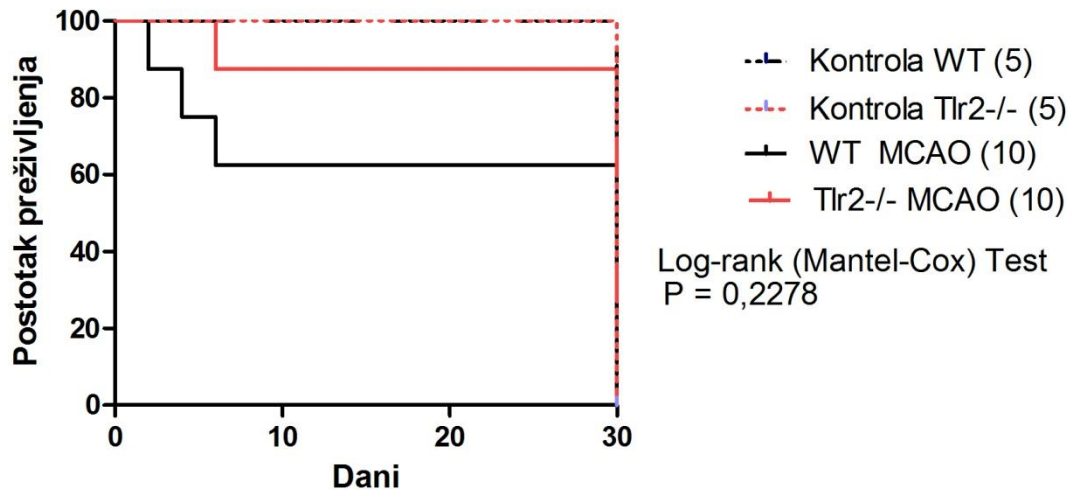
Ranije objavljeno istraživanje dr. Ivana Boha eka iz našeg laboratorija bavilo se određivanjem razlike u veličini izravnog i neizravnog volumena ishemijske lezije kod miševa divljeg tipa i Tlr2<sup>-/-</sup> i u njemu je zaključeno da se kod miševa s onomogenim Tlr2 genom ishemijska ozljeda povećava u kasnijim vremenskim točkama nakon MCAO (7 i 14 dana), iako je u ranijoj fazi odgovora na ishemijsku leziju (3. dan) volumen lezije manji u odnosu na skupinu miševa divljeg tipa (120). Stoga to nije bio predmet analize ovog doktorata.

### 5.1.3. Preživljenje nakon MCAO jednako je kod Tlr2<sup>-/-</sup> i miševa divljeg tipa

Standardizirani MCAO postupak ima najveću u početnu smrtnost od 20% unutar 24 sata u standardnim uvjetima uzgoja (172). Uvježbavanjem postupka i održavanjem postoperativne njege postignuto je preživljenje od 100% tijekom 24 h kod uspješno provedenog zahvata. Preživljenje kroz 7 dana bilo je 70%. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja prikazuje razliku u dostizanju humane krajnje točke za miševe divljeg tipa i Tlr2<sup>-/-</sup> koji su podvrgnuti MCAO i njihove pripadajuće kontrole (Slika 24.). Iako se primjećuje trend većeg preživljenja kod

Tlr2<sup>-/-</sup>, prema ina ici log-rank testa za neparametrijske uzorke (Mantel-Cox) razlika nije statisti ki zna ajna (P=0,2278).

Iz prikazanog se mođe zaklju iti tek o trendu da flivotinje s neaktivnim *Tlr2* genom kasnije (4 dan) dostiflu humanu krajnju to ku u odnosu na svoje kontrole divljeg tipa (WT), -to govori u prilog odgo enim zbivanjima upale i nekroze u mozgu bez TLR2.



**Slika 24.** Krivulja preživljenja po genotipovima i tretmanu. Etička krajnja točka postignuta je kod 4 životinje divljeg tipa (WT) te 1 životinje Tlr2<sup>-/-</sup> genotipa, što se s vrijednošću P=0,2278 prema Log-rank testu nije pokazalo statistički značajnom razlikom među skupinama. Preživljenje kontrola WT i Tlr2<sup>-/-</sup> skupina bilo je 100% cijelim tijekom ispitivanja.

## 5.2. Testovi ponašanja miševa kao mjera funkcionalnog oporavka nakon ishemijskog oštećenja

### 5.2.1. Tlr2<sup>-/-</sup> miševi nakon MCAO manje gube na tjelesnoj težini u odnosu na miševu divljeg tipa

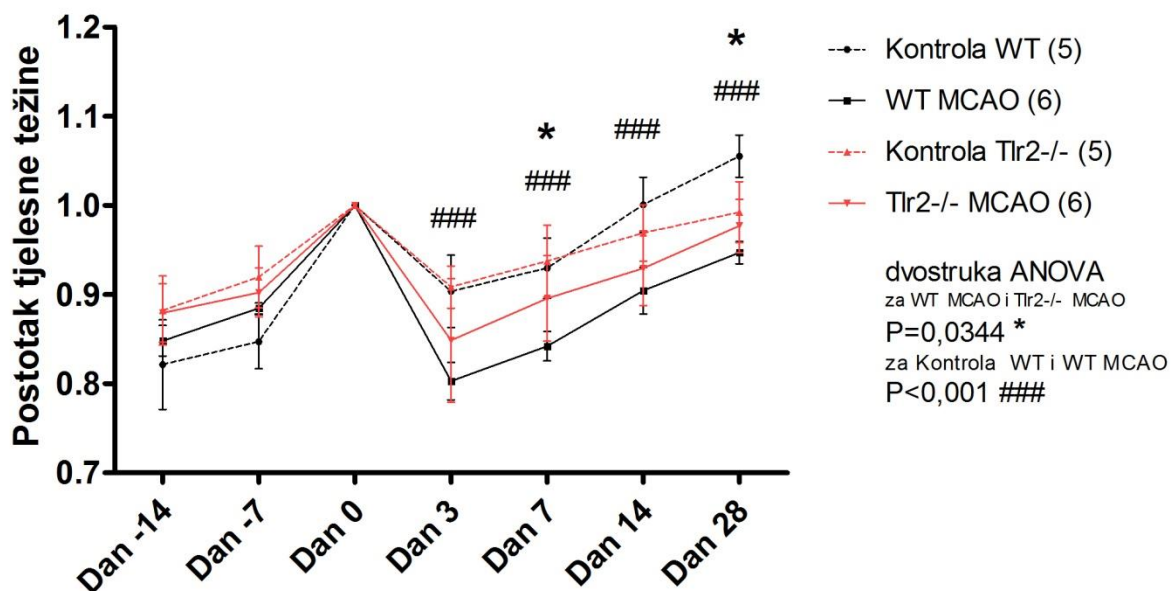
Prosje ne tjelesne tefline miševa u Danu 0 Tlr2<sup>-/-</sup> i WT genotipa zadovoljavale su uvjet normalne raspodjele i nisu se statisti ki zna ajno razlikovale (24,67g, SD=±2,534g za WT; 24,12 g, SD=±1,081g za Tlr2<sup>-/-</sup>), te je zornije bilo predo iti kretanje tjelesne tefline po pojedinoj flivotinji tako da je vrijednost u svakoj vremenskoj to ki prikazana u odnosu na tjelesnu teflinu na dan samog zahvata (Dan 0).

Tijekom oporavka nakon operativnog zahvata bio je o ekivan gubitak tjelesne tefline uslijed op eg stresa uzrokovanog o-te enjem tkiva na vratu kod kontrolnih flivotinja, odnosno o-te enja tkiva na vratu i ishemijske mozga kod MCAO tretiranih flivotinja (173).

Pra enje tjelesne teffine nakon ishemijskog o-te enja (od 3. do 28. dana) uspore ivano dvostrukim ANOVA testom za ponavljana mjerenja pokazalo je statisti ki zna ajnu razliku (P=0,0344) izme u skupina Tlr2-/- i WT s MCAO.

Promatraju i odnos lafno operiranih kontrola za WT i skupine s ishemijskim o-te enjem WT genotipa, uo ava se statisti ki izrazito zna ajna razlika s P<0,0001, dok unutar skupina Tlr2-/- genotipa takva razlika ne postoji (2-struka ANOVA za povezane uzorke Tlr2-/- kontrola i Tlr2-/- s MCAO, P= 0,0889). Kako bi se potvrdilo da su lafno operirane kontrole predstavljale skupine koje se mogu me usobno uspore ivati, provjereno je postoji li statisti ka zna ajna razlika izme u kretanja tjelesne teffine skupina WT i Tlr2-/- bez MCAO te je razina zna ajnosti od P=0,2554 ukazala me u njima takve razlike ne postoje.

Dodatnom analizom t-testom po vremenskim to kama nakon zahvata (3. do 28. dan), divlji tipovi s MCAO se u svakom trenutku statisti ki zna ajno razlikuju od svojih lafno operiranih kontrola, a 7. i 28. dana imaju statisti ki zna ajno manju tjelesnu teffinu u odnosu na Tlr2-/- mi-eve s MCAO (P=0,027). Kod Tlr2-/-ne dolazi do takvog statisti ki zna ajnog pada kad se uspore uju lafno operirane kontrole i flivotinje tretirane s MCAO, niti postoji razlika ako izravno uspore ujemo divlje tipove i Tlr2-/- zahva ene ishemiijom (Slika 24., Tablica 13).



**Slika 25.** Tjelesna težina normalizirana prema vrijednostima na dan MCAO zahvata. Mjerila se 2 tjedna prije, te mjesec dana nakon MCAO u vremenskim točkama 2, 7, 14 i 28 dana. Crno su označeni divlji tipovi (WT), a crveno Tlr2-/-. Isprekidanom linijom su označene vrijednosti lažno operiranih kontrola, a punom linijom vrijednosti MCAO tretiranih životinja.

**Tablica 13.** Tjesna težina sa standardnom pogreškom po ispitivanim skupinama i vremenskim točkama, normalizirana za pojedinu životinju u odnosu na vrijednost Dana 0. Prikazane su P vrijednosti za t-testove između pojedinih skupina unutar iste vremenske točke. Statistički značajne razlike istaknute su masno otisnutim podcrtanim P vrijednostima.

Tjelesna težina (grami)	Kontrola WT (5)	WT MCAO (6)	P za WT	Kontrola Tlr2-/- (5)	Tlr2-/- MCAO (6)	P za Tlr2-/-	P za WT MCAO vs Tlr2-/- MCAO
Dan -14	0,821± 0,021	0,848± 0,007		0,882± 0,017	0,879± 0,013		
Dan -7	0,847± 0,012	0,885± 0,003		0,920± 0,015	0,902± 0,011		
Dan 0	1	1		1	1		
Dan 3	0,904± 0,017	0,803± 0,009	<b><u>0,0003</u></b>	0,908± 0,011	0,849± 0,028	0,1013	0,1547
Dan 7	0,930± 0,014	0,842± 0,007	<b><u>0,0002</u></b>	0,937± 0,018	0,896± 0,020	0,1556	<b><u>0,0270</u></b>
Dan 14	1,001± 0,013	0,904± 0,011	<b><u>0,0002</u></b>	0,969± 0,014	0,929± 0,017	0,1166	0,2431
Dan 28	1,055± 0,010	0,947± 0,005	<b><u>0,0001</u></b>	0,992± 0,015	0,977± 0,012	0,4507	<b><u>0,0465</u></b>

Najmanja tjelesna težina nakon MCAO cijelo vrijeme nakon zahvata je izmjerena kod divljih tipova s ishemijskim oštećenjem 3 dan, a najveća u pak odražavaju lažno operirani divlji tipovi. Izostanak razlike u tjelesnoj težini kod Tlr2-/- životinja koje su lažno operirane u odnosu na MCAO tretirane Tlr2-/- životinje govori u prilog činjenici da na njihov početni gubitak težine od 3 dana nakon MCAO u najvećoj mjeri utječe sam zahvat otvaranja pristupa lijevoj karotidnoj arteriji, a da ishemijsko oštećenje ne doprinosi značajno njihovoj kaheksiji.

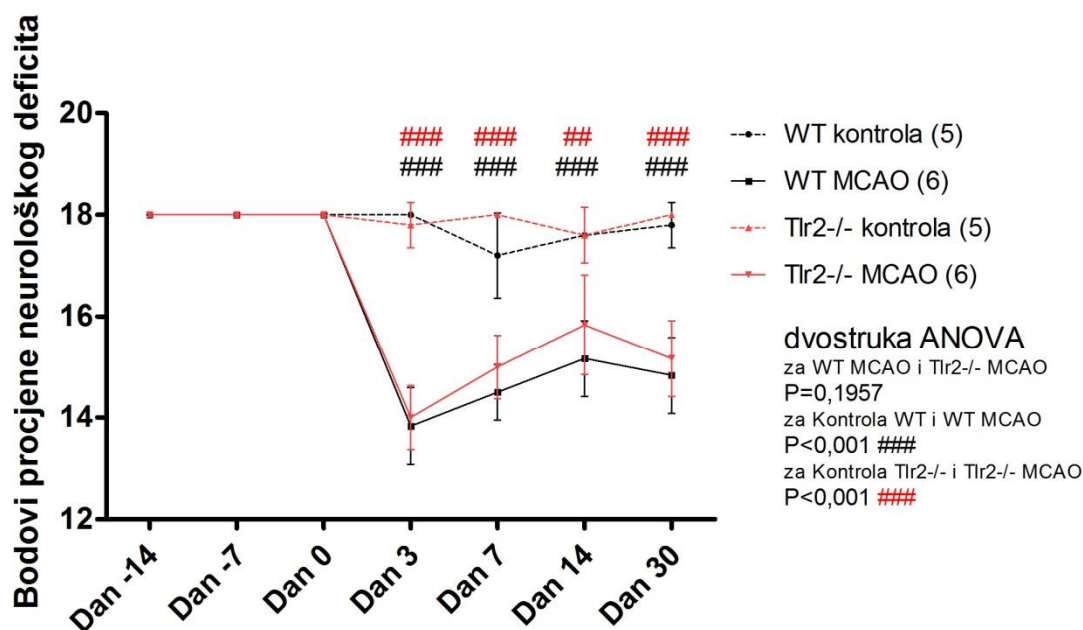
Ishemijsko oštećenje utječe na tjelesnu težinu smanjenjem sposobnosti žvakanja hrane (što je svedeno na najmanju moguću mjeru korištenjem mekane hrane u obliku kašice prvih 7 dana nakon zahvata, vidi Poglavlje 3.4.5 Postoperativna njega), ali i utjecajem na spontano kretanje, što je bilo moguće utvrditi testovima spontanog kretanja kao što su Schallertov cilindar i Y-labirint.

Pri tom se izmjerena tjelesna težina može odraziti na preostale testove ponajviše, osobito one gdje se promatraju ambulatorni parametri (broj dizanja, odražavanje na rotarodu) stoga je prilikom analize tih rezultata potrebno u obzir uzeti utvrđene razlike.

### 5.2.2. Neurološko oštećenje nakon MCAO prisutno je kod oba genotipa

Praćenjem neurološkog deficita u dvostrukom ANOVA testu statistički značajno su identificirani miševi koji su podvrgnuti MCAO zahvatu. Njihovi bodovi neurološkog deficita (najviše 18) su se znatno smanjili u odnosu na lažno operirane kontrole neovisno o genotipu i to s razinom značajnosti  $P < 0,001$ , dok istim testom nije utvrđena razlika između Tlr2-/- i WT miševa s MCAO ( $P = 0,1957$ ) (Slika 26.).

U t-testu izme u skupina u pojedinoj vremenskoj to ki, divlji tipovi s ishemijskim o-te enjem su se u svakoj vremenskoj to ki nakon Dana 0 izrazito statisti ki zna ajno razlikovali lo-ijim neurolo-kim stanjem u odnosu na svoje lafno operirane kontrole (Tablica 14). Unutar Tlr2-/- genotipa rezultat se razlikuje samo u to ki 14. dana nakon MCAO gdje razina statisti ke zna ajnosti tek ne-to manja (P=0,0061), no i dalje ne postoje statisti ki zna ajne razlike ukoliko se uspore uju skupine WT i Tlr2-/- s MCAO.



**Slika 26** Neurološki deficit se pratio 2 tjedna prije zahvata, te mjesec dana potom u vremenskim točkama od 3, 7 14 i 30 dana. Crno su označeni divlji tipovi (WT), a crveno Tlr2-/- . Isprekidanom linijom su označene vrijednosti lažno operiranih kontrola, a punom linijom vrijednosti MCAO tretiranih životinja.

**Tablica 14.** Neurološko oštećenje sa standardnom pogreškom po ispitivanim skupinama i vremenskim točkama. Prikazane su P vrijednosti za t-testove između pojedinih skupina unutar iste vremenske točke. Statistički značajne razlike istaknute su masno otisnutim podcrtanim P vrijednostima.

Neurološko oštećenje (bodovi)	WT kontrola (5)	WT MCAO (6)	P za WT	Tlr2-/- kontrola (5)	Tlr2-/- MCAO (6)	P za Tlr2-/-	P za WT MCAO vs Tlr2-/- MCAO
Dan -14	18± 0	18± 0		18± 0	18± 0		
Dan -7	18± 0	18± 0		18± 0	18± 0		
Dan 0	18± 0	18± 0		18± 0	18± 0		
Dan 3	18± 0	13,83± 0,31	<u>&lt;0,0001</u>	17,8± 0,2	14± 0,26	<u>&lt;0,0001</u>	0,6867
Dan 7	17,2± 0,37	14,5± 0,22	<u>&lt;0,0001</u>	18± 0	15± 0,26	<u>&lt;0,0001</u>	0,1739
Dan 14	17,6± 0,24	15,17± 0,31	<u>0,0002</u>	17,6± 0,24	15,83± 0,40	<u>0,0061</u>	0,2167
Dan 30	17,8± 0,2	14,83± 0,31	<u>&lt;0,0001</u>	18± 0	15,17± 0,31	<u>&lt;0,0001</u>	0,4608



Kod svih miševa s ishemijskim oštećenjem postoji trend poboljšanja do 14. dana i potom kratkog zadržavanja na istoj razini, ili čak opadanja u završnoj vremenskoj točki od 30 dana.

### **5.2.3. Spontano kretanje i asimetrična uporaba prednjih udova ukazuju na odgođeni nastup oštećenja kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> u odnosu na miševe divljeg tipa**

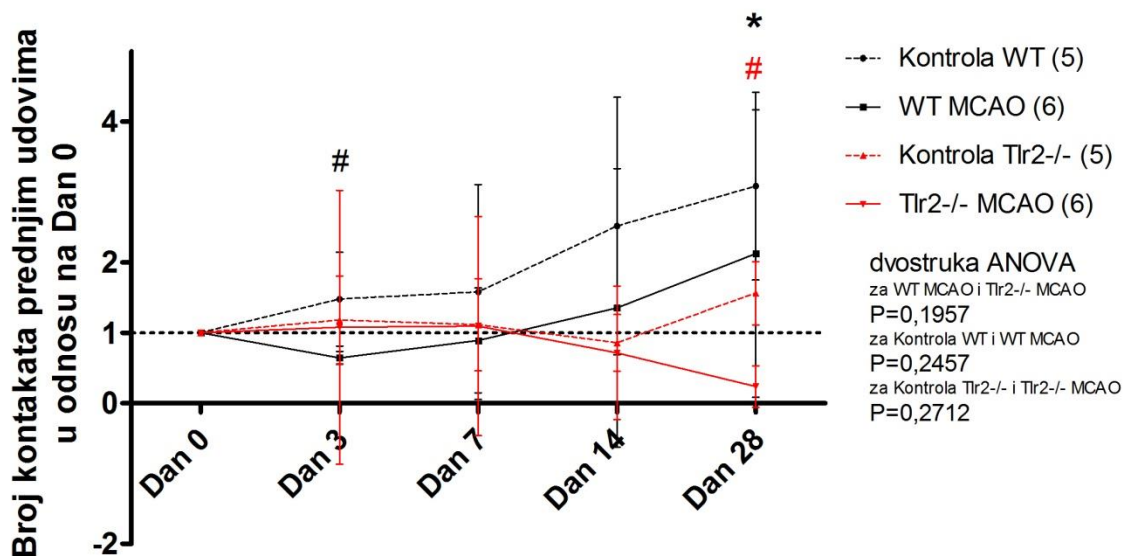
#### **5.2.3.1. Ukupno spontano kretanje u Schallertovom cilindru pokazuje odgođeno oštećenje kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> u odnosu na miševe divljeg tipa**

Ukupno kretanje u Schallertovom cilindru predstavljalo je zbroj svih kontakata prednjim udovima po stijenci cilindra od lijevanog akrilnog stakla (pleksiglasa) i prilikom povratka na tlo. Miševi su bili privikavani na test 2 tjedna prije zahvata, no mjerenja kretanja otpočela su od dana 0.

Ukupni broj kontakata prednjim udovima miševa u Danu 0 za početne vrijednosti *Tlr2*<sup>-/-</sup> i WT genotipa zadovoljavao je uvjet normalne raspodjele i skupine se nisu međusobno statistički značajno razlikovale ( $16,78 \pm 3,94$  za WT;  $11,30 \pm 2,47$  za *Tlr2*<sup>-/-</sup>), te je zornije bilo predložiti dinamiku ukupnog broja kontakata po pojedinoj fivotinji tako da je vrijednost u svakoj vremenskoj točki prikazana u odnosu na početni broj kretanja (Slika 27).

Dvostruka ANOVA za ponovljena mjerenja nije ukazala na statistički značajne razlike između pojedinih skupina nakon ishemijskog oštećenja s  $P=0,1957$  između WT i *Tlr2*<sup>-/-</sup> s MCAO, te  $P=0,02457$  između skupina divljeg tipa (Kontrola WT i WT s MCAO) i  $0,2712$  između skupina s onemogućenim *Tlr2* genom (Kontrola *Tlr2*<sup>-/-</sup> i *Tlr2*<sup>-/-</sup> s MCAO).

Lafno operirani WT miševi kontinuirano postupno povećavaju broj kontakata prednjim udovima, što znači da sam zahvat otvaranja pristupa na vratu nije smanjio broj kretanja u odnosu na početne vrijednosti. Skupina WT miševa s ishemijskim oštećenjem zabilježila je statistički značajan početni pad kretanja 3. dan nakon MCAO ( $P=0,0134$ , t-test), što govori u prilog podljeve akutnoj postishemijskoj upali. Potom se postupno oporavljaju i prate trend svojih lafno operiranih kontrola, no nakon mjesec dana ih još ne uspijevaju dostići (Tablica 15.).



**Slika 27.** Ukupno kretanje u Schallertovom cilindru mjereno je neposredno prije zahvata te u vremenskim točkama 3, 7, 14 i 28 dana po zahvatu. Crno su označeni divlji tipovi (WT), a crveno Tlr2<sup>-/-</sup>. Isprekidanom linijom su označene vrijednosti lažno operiranih kontrola, a punom linijom vrijednosti MCAO tretiranih životinja.

**Tablica 15.** Ukupno kretanje u Schallertovom cilindru normalizirano na vrijednosti pojedinog miša na Dan 0, sa standardnom pogreškom po ispitivanim skupinama i vremenskim točkama. Prikazane su P vrijednosti za t-testove između pojedinih skupina unutar iste vremenske točke. Statistički značajne razlike istaknute su masno otisnutim podcrtanim P vrijednostima.

Ukupno kretanje	Kontrola WT (5)	WT MCAO (6)	P za WT	Kontrola Tlr2 <sup>-/-</sup> (5)	Tlr2 <sup>-/-</sup> MCAO (6)	P za Tlr2 <sup>-/-</sup>	P za WT MCAO vs Tlr2 <sup>-/-</sup> MCAO
Dan 0	1	1		1	1		
Dan 3	1,48 ± 0,30	0,64 ± 0,04	<b>0,0134</b>	1,18 ± 0,28	1,08 ± 0,79	0,9138	0,5961
Dan 7	1,58 ± 0,68	0,89 ± 0,30	0,3528	1,11 ± 0,29	1,09 ± 0,64	0,9820	0,7775
Dan 14	2,52 ± 0,82	1,35 ± 0,81	0,3418	0,86 ± 0,18	0,72 ± 0,39	0,7657	0,4918
Dan 28	3,08 ± 0,60	2,12 ± 0,83	0,3924	1,56 ± 0,20	0,24 ± 0,12	<b>0,0002</b>	<b>0,0490</b>

Kod lažno operiranih Tlr2<sup>-/-</sup> kontrola ukupni broj kretanja se kroz mjesec dana održavao oko po etnih vrijednosti s blagim porastom 28. dana. nakon lažnog zahvata.

Tlr2<sup>-/-</sup> miševi s ishemijskim oštećenjem održavaju broj kontakata prednjim udovima na po etnoj razini sve do blagog pada 2 tjedna nakon MCAO, a potom se u vremenskoj točki od mjesec dana po tom parametru statistički značajno razlikuju od svojih Tlr2<sup>-/-</sup> lažno operiranih kontrola (s razlikom srednjih vrijednosti od 1,33 ± 0,23, 95% IP=od 0,8176 do 1,837, P=0,0002).

U istoj se vremenskoj točki (Dan 28), poglavito zahvaljuju i naglom padu ukupnog broja kretanja kod Tlr2<sup>-/-</sup> s MCAO, pojavila i statistički značajna razlika između divljeg tipa i Tlr2<sup>-/-</sup>



s MCAO gdje su mi-evi Tlr2-/- genotipa u prosjeku imali za  $189\% \pm 84\%$  manje kretnji (95% IP= 1% do 376%, P=0,049)

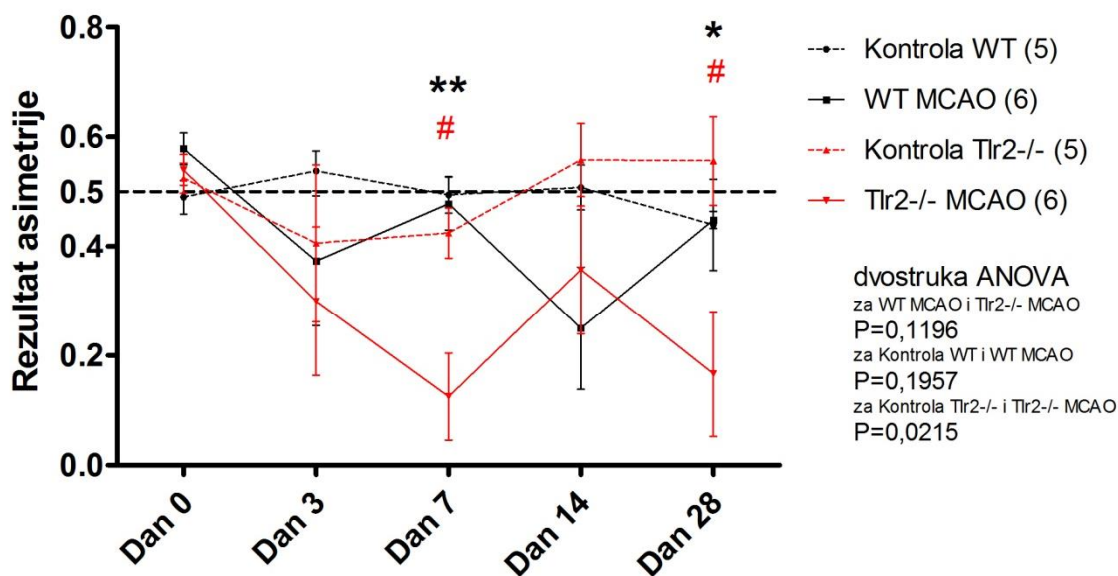
To upu uje na zaklju ak da ishemijsko o-te enje amplificira razlike u ukupnoj koli ini spontanih kretnji izme u divljeg tipa i Tlr2-/- do razine statisti ke zna ajnosti. Pored toga, mi-evi s djelatnim TLR2 (WT) razvijaju akutno motori ko o-te enje s postupnim oporavkom nakon Dana 3, dok mi-evi bez djelatnog TLR2 (Tlr2-/-) nakon 7 dana po inju smanjivati broj svojih sponatnih kretnji te postignu najmanju vrijednost Dana 28, kad se dovoljno statisti ki razlikuju i od svojih lafno operiranih kontrola i od divljih tipova s MCAO.

### ***5.2.3.2. Izrazitija asimetrija uporabe prednjih udova kod Tlr2-/- u odnosu na miševe divljeg tipa***

Schallertov rezultat asimetrije prikazuje preferenciju flivotinje da koristi jedan od prednjih udova u odnosu na drugi. Testom dvostruke ANOVA-e nisu utvr ene statisti ki zna ajne razlike izme u pojedinih skupina (Slika 28.). No, analize unutar vremenskih to aka su pokazale kako se 7 dana nakon MCAO rezultat asimetrije statisti ki zna ajno razlikovao izme u divljeg tipa i Tlr2-/- s MCAO s izraflenijom asimetrijom uporabe prednjih udova kod mi-eva bez TLR2 (srednja razlika -0,35, 95% IP= od 0,15 do 0,56, P=0,0034). Istovremeno se javlja i statisti ki zna ajna razlika izme u skupina Tlr2-/- genotipa, gdje Tlr2-/- mi-evi s MCAO rezultatom od 0,125 zna ajno odstupaju od normalne vrijednosti od 0,5 i vrijednosti svojih lafno operiranih kontrola (P=0,0218).

Potom 14. dana ta razlika nakratko nestaje da bi se opet pojavila 28. dana nakon MCAO. Tad se Tlr2-/- mi-evi s MCAO statisti ki zna ajno razlikuju slabijim kori-tenjem kontralateralnog uda prikazano rezultatom asimetrije i od svojih lafno operiranih kontrola (P=0,037) i od WT mi-eva s MCAO (P=0,0343).

Divlji tipovi ne pokazuju razliku u rezultatu asimetrije nakon MCAO u odnosu na svoje lafno operirane kontrole ni u jednoj vremenskoj to ki (Slika 28.).



**Slika 28.** Rezultat asimetrije u Schallertovom cilindru mjeren je neposredno prije zahvata na Dan 0 te u vremenskim točkama 3, 7, 14 i 28 dana po zahvatu. Crno su označeni divlji tipovi (WT), a crveno Tlr2-/. Isprekidanom linijom su označene vrijednosti lažno operiranih kontrola, a punom linijom vrijednosti MCAO tretiranih životinja. Simetrično kretanje ima rezultat 0,5 (crna crtkana oznaka).

**Tablica 16.** Rezultat asimetrije u Schallertovom cilindru sa standardnom pogreškom po ispitivanim skupinama i vremenskim točkama. Prikazane su P vrijednosti za t-testove između pojedinih skupina unutar iste vremenske točke. Statistički značajne razlike istaknute su masno otisnutim podcrtanim P vrijednostima.

Rezultat asimetrije Vrijeme	Kontrola WT (5)	WT MCAO (6)	P za WT	Kontrola Tlr2-/- (5)	Tlr2-/- (6)	P za Tlr2-/-	P za WT MCAO vs Tlr2-/- MCAO
Dan 0	0,490± 0,031	0,578± 0,029	0,0790	0,525± 0,028	0,540± 0,028	0,7264	0,3642
Dan 3	0,538± 0,037	0,373± 0,119	0,3088	0,406± 0,144	0,299± 0,136	0,6174	0,6921
Dan 7	0,494± 0,033	0,478± 0,048	0,8148	0,424± 0,046	0,125± 0,079	<b>0,0218</b>	<b>0,0034</b>
Dan 14	0,508± 0,041	0,250± 0,112	0,1112	0,558± 0,067	0,357± 0,117	0,2322	0,5243
Dan 28	0,440± 0,083	0,448± 0,016	0,9031	0,556± 0,081	0,167± 0,114	<b>0,0370</b>	<b>0,0343</b>

Uzmu li se u obzir oba parametra dobivena promatranjem u Schallerotvom cilindru, zaklju uje se kako Tlr2-/- mi-evi imaju op enito manje kretnji uspravljanja u odnosu na mi-eve divljeg tipa. To doprinosi njihovom povratu izgubljene tjelesne teffine nakon zahvata i njenom odrflavanju.

Tlr2-/- s MCAO imaju statisti ki zna ajno izrafleniju asimetriju prilikom uporabe prednjih udova u odnosu na divlje tipove u subakutnoj fazi, 7. dana nakon zahvata, a potom ta razlika nakratko nestaje te se ponovno pojavljuje 28. dana.

U kroničnoj fazi udjeljiva je jasna asimetrija korištenja udova kod Tlr2-/- miševa tretiranih s MCAO u odnosu na njihove kontrole istog genotipa, za razliku od miševa divljeg tipa kod kojih postoji tendencija asimetričnom korištenju prednjih udova kod miševa s ishemijskim oštećenjem, ali ona nikada ne prelazi razinu statističke značajnosti u usporedbi s njihovim lažno operiranim kontrolama.

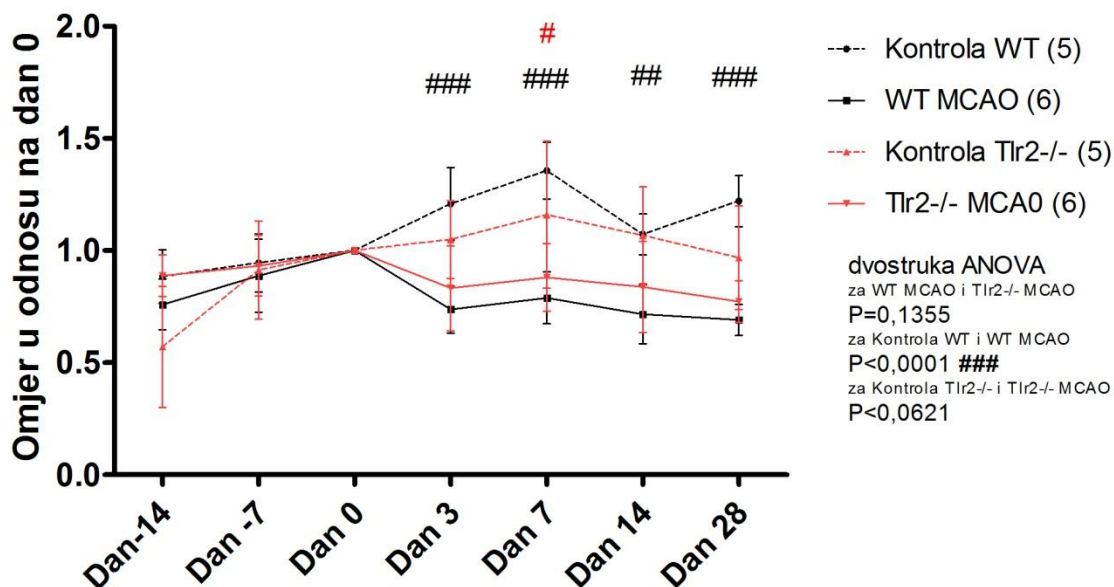
Dok ukupni broj spontanog kretanja pokazuje opću razinu aktivnosti, rezultat asimetrije je specifičan za identifikaciju neurološkog simptoma koji je ekvivalent hemiparezi.

#### **5.2.4. Tlr2-/- miševi kasnije razvijaju motoričko oštećenje u odnosu na miševe divljeg tipa**

Dok se u Schallertovom cilindru promatrala spontana aktivnost, ubrzavaju im rotarodom promatrala se prinudna motorna koordinacija i ravnoteža.

Kontrole divljih tipova nastavljaju napredovati u svojim rezultatima nakon zahvata 3. dan na 121% i 7. dan 136% u odnosu na početne vrijednosti ustanovljene na Dan 0. Stoga otvaranje pristupa na vratu samo po sebi nije uzrokovalo raniji prekid testa kod divljih tipova. Divlji tipovi s ishemijskim oštećenjem, unatoč svojoj niskoj tjelesnoj težini koja im olakšava kretanje, pokazuju najslabije održavanje na rotarodu u odnosu na preostale ispitivane skupine s naglim padom trajanja testa na 74% početne vrijednosti 3. dan poslije operacije. Potom se njihov prosječni rezultat poboljšava (78%) i stabilizira na 70% vlastitih početnih vrijednosti iz Dana 0 (Slika 30., Tablica 17.).

Naime, analize unutar vremenskih točaka su pokazale kako se 7 dana nakon MCAO rezultat asimetrije statistički značajno razlikovao između divljeg tipa i Tlr2-/- s MCAO s izraženijom asimetrijom uporabe prednjih udova kod miševa bez TLR2 (srednja razlika -0,35, 95% IP= od 0,15 do 0,56, P=0,0034). Istovremeno se javlja i statistički značajna razlika između skupina Tlr2-/- genotipa, gdje Tlr2-/- miševi s MCAO rezultatom od 0,125 značajno odstupaju od normalne vrijednosti od 0,5 i vrijednosti svojih lažno operiranih kontrola (P=0,0218). Potom 14. dana ta razlika nakratko nestaje da bi se opet pojavila 28. dana nakon MCAO. Tad se Tlr2-/- miševi s MCAO statistički značajno razlikuju slabijim korištenjem kontralateralnog uda prikazano rezultatom asimetrije i od svojih lažno operiranih kontrola (P=0,037) i od WT miševa s MCAO (P=0,0343). Divlji tipovi ne pokazuju razliku u rezultatu asimetrije nakon MCAO u odnosu na svoje lažno operirane kontrole ni u jednoj vremenskoj točki (Slika 29).



**Slika 29.** Održavanje na ubrzavajućem rotarodu uvježbavalo se 2 tjedna prije zahvata u 3 navrata (dan -14, dan -7) te mjerilo na dan 0 neposredno prije zahvata, te u vremenskim točkama 3,7,14 i 28 dana po zahvatu. Crno su označeni divlji tipovi (WT), a crveno Tlr2-/. Isprekidanom linijom su označene vrijednosti lažno operiranih kontrola, a punom linijom vrijednosti MCAO tretiranih životinja.

**Tablica 17.** Trajanje održavanja normalizirano na vrijednosti pojedinog miša na Dan 0, sa standardnom pogreškom po ispitivanim skupinama i vremenskim točkama. Prikazane su P vrijednosti za t-testove između pojedinih skupina unutar iste vremenske točke. Statistički značajne razlike istaknute su masno otisnutim podcrtanim P vrijednostima.

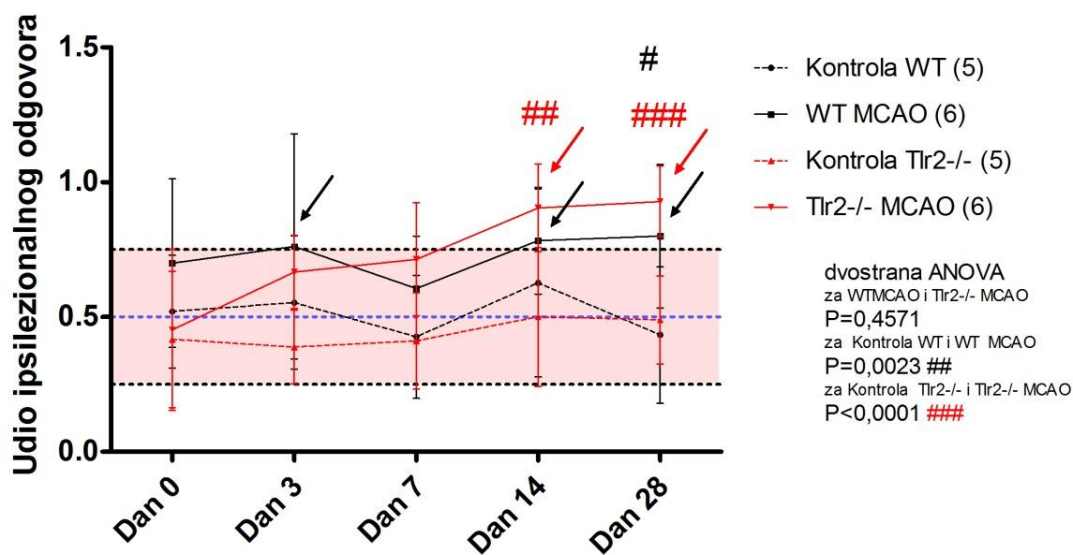
Vrijeme	Kontrola WT (5)	WT MCAO (6)	P za WT	Kontrola Tlr2-/- (5)	Tlr2-/- (6)	P za Tlr2-/-	P za WT MCAO vs Tlr2-/- MCAO
Dan -14	0,884± 0,048	0,759± 0,046		0,570± 0,121	0,888± 0,038		
Dan -7	0,945± 0,053	0,888± 0,066		0,913± 0,098	0,932± 0,056		
Dan 0	1	1		1	1		
Dan 3	1,208± 0,066	0,737± 0,043	<b>0,0001</b>	1,049± 0,077	0,833± 0,078	0,0815	0,3047
Dan 7	1,357± 0,052	0,789± 0,047	<b>≤0,0001</b>	1,160± 0,147	0,880± 0,062	<b>0,0467</b>	0,2676
Dan 14	1,072± 0,037	0,716± 0,053	<b>0,0003</b>	1,068± 0,097	0,838± 0,083	0,1031	0,2448
Dan 30	1,221± 0,047	0,691± 0,028	<b>≤.0001</b>	0,968± 0,104	0,772± 0,038	0,0894	0,1186

Tlr2-/- miševi tretirani s MCAO su u akutnoj vremenskoj točki bilježili blagi pad u usporedbi s WT, na 83% po etnih vrijednosti, što je ostalo stabilno i subakutno na 88% 7. dana, 84% 14. dana, a potom se ponovno javio blagi pad u kroničnoj vremenskoj točki 28. dana na 77%. Statistički značajna razlika u usporedbi lažno operiranih Tlr2-/- kontrola i Tlr2-/- miševa s MCAO postoji samo 7 dana nakon ishemijskog oštećenja s prosječnom razlikom od 28% (95% IP=od -5% do 60%, P=0,0467). Takvi rezultati upućuju na zaključak da se i lažno

operirani miševi Tlr2<sup>-/-</sup> genotipa sporije oporavljaju od zahvata u odnosu na svoje lažno operirane kontrole divljeg tipa, no bez identificirane statistički značajne razlike. To ukazuje na znatno opterećenje samog zahvata, sa i bez ishemije, na sposobnost životinja Tlr2<sup>-/-</sup> genotipa da se održavaju na rotarodu, dok je kod životinja divljeg tipa utjecaj ishemijskog oštećenja onaj koji je presudan za performanse na rotarodu. Ishemijsko oštećenje samo po sebi slabije pogađa Tlr2<sup>-/-</sup> miševe u pogledu održavanja na ubrzavajućem rotarodu, te se značajno otkriva tek 7. dana – to je odgođeno u odnosu na miševe divljeg tipa koji se značajno lošije održavaju u testu već 3. dana nakon MCAO. Tlr2<sup>-/-</sup> miševi s MCAO su u svakoj vremenskoj točki postizali bolje rezultate od svojih kontrola divljeg tipa s MCAO, no ni u jednom trenutku ta razlika nije statistički značajna.

### 5.2.5. Poremećaj osjeta dodira ima blaži nastup, a zadržava se dulje kod Tlr2<sup>-/-</sup> u odnosu na miševe divljeg tipa

U testu obostranog podražaja dodiranjem pokazalo se kako se po etne vrijednosti za udio preferirane reakcije na podražaj lijeve prednje šape (ipsilezionalni stimulus) kreću između 38% kod Tlr2<sup>-/-</sup>, odnosno 64% kod WT miševa (ukupna prosječna vrijednost 51%), sa standardnom devijacijom od približno 25% (25,8% za Tlr2<sup>-/-</sup>; 27,8 za WT).



**Slika 30.** Obostranim podražajem dodira mjerila se asimetrična reakcija. Prikazana je udjelom jednostranog (ipsilezionalnog) odgovora na dan 0 neposredno prije zahvata, te u vremenskim točkama 3, 7, 14 i 28 dana po zahvatu. Crno su označeni divlji tipovi (WT), a crveno Tlr2<sup>-/-</sup>. Isprekidanom linijom označene su vrijednosti lažno operiranih kontrola, a punom linijom vrijednosti MCAO tretiranih životinja. Plava isprekidana linija označava simetričnu reakciju s prosječnom vrijednošću ipsilezionalnog odgovora od 50% dok crveno osjenčano područje označava početni raspon standardne devijacije (SD=±25%).

**Tablica 18.** Koeficijent asimetrične reakcije sa standardnom pogreškom po ispitivanim skupinama i vremenskim točkama. Prikazane su P vrijednosti za t-testove između pojedinih skupina unutar iste vremenske točke. Statistički značajne razlike istaknute su masno otisnutim podcrtanim P vrijednostima

Vrijeme	Kontrola WT (5)	WT MCAO (6)	P za WT	Kontrola Tlr2-/- (5)	Tlr2-/- (6)	P za Tlr2-/-	P za WT MCAO vs Tlr2-/- MCAO
Dan 0	0,520± 0,093	0,740± 0,094	0,1194	0,472± 0,109	0,452± 0,113	0,9028	0,0734
Dan 3	0,553± 0,111	0,762± 0,181	0,4694	0,389± 0,056	0,667± 0,051	<b>0,0370</b>	0,7573
Dan 7	0,427± 0,102	0,606± 0,080	0,1933	0,411± 0,073	0,714± 0,079	<b>0,0177</b>	0,3556
Dan 14	0,627± 0,156	<b>0,783± 0,081</b>	0,3727	0,500± 0,105	<b>0,905± 0,061</b>	<b>0,0055</b>	0,2504
Dan 28	0,433± 0,113	<b>0,800± 0,109</b>	<b>0,0452</b>	0,489± 0,067	<b>0,929± 0,050</b>	<b>0,0002</b>	0,3695

Dvostranim ANOVA testom za ponovljena mjerenja statistički izrazito značajna razlika pokazala se samo pri usporedbi Tlr2-/- miševa s MCAO i njihovim lažno operiranim kontrolama ( $P < 0,0001$ ), dok takva razlika nije nađena između skupina divljeg tipa ( $P = 0,0023$ ), niti u usporedbi WT i Tlr2-/- miševa s MCAO ( $P = 0,4571$ ).

Kontrolne skupine lažno operiranih miševa za oba genotipa nisu u jednoj vremenskoj točki prelazile raspon standardne devijacije od 25% do 75%. Kako bi se pojedini rezultat razmatrao kao statistički značajna razlika, on prvo mora prelaziti navedene granice, a tek ga se potom uspoređivalo s prosječnom vrijednosti i varijancom kontrolne skupine.

Skupina WT miševa s MCAO je 3. dan nakon zahvata prosječnom vrijednosti testa od 76,2% prešla rub zone SD-a (od 25% do 75%). Potom je u subakutnoj vremenskoj točki od 7. dana rezultat nakratko ušao u normalni raspon sa 60,6% da bi ponovno porastao u kroničnim vremenskim točkama od 14. dana na 78,3% i 80% 28. dana nakon zahvata (Slika 38, Tablica 18.). Obzirom na varijancu kontrolne skupine, WT s MCAO se statistički značajno razlikuje od lažno operiranih WT miševa samo 28. dana s prosječnom razlikom od 37% (95% IP= 72% do 9,8%,  $P = 0,0452$ ).

Kod Tlr2-/- miševa s MCAO akutna reakcija 3. dana nije bila tako izrazita kao kod divljeg tipa, te je sa 66,7% ostala unutar zone SD-a. Sedmi dan je nastupilo blago povećanje na 71,4%, da bi tek u kroničnim vremenskim točkama izašla iz zone SD-a sa 90,5% 14. dana i 92,8% 28. dana, te pri tome u oba slučaja premašla vrijednosti divljih tipova s MCAO.

U iste se dvije vremenske točke ta skupina statistički značajno razlikovala od svojih lažno operiranih kontrola Tlr2-/- genotipa tako da je udio ipsilezionalnog odgovora bio u prosjeku

ve i za 40,5% (95% IP = 15% do 66%,  $P=0,0055$ ) 14.dana, odnosno za 44% (95% IP= 26% do 62%,  $P=0,0002$ ).

U skladu s rezultatom asimetrije u broju prvih kontakata preferirane prednje –ape jest i rezultat latencije od trenutka kontaktiranja naljepnice na prednjoj desnoj –api, do trenutka njezinog uklanjanja (Slika 31.; Tablica 19).

Lafno operirani mi–evi oba genotipa uklanjali su naljepnice u prosjeku unutar prvih 10 sekundi od kontaktiranja, kao –to je bio slu aj prilikom mjerenja za po etne vrijednosti kod skupina koje su kasnije bile podvrgnute ishemijskom o–te enju.

Tri dana nakon MCAO kod WT fivotinja dolazi do produljenja latencije u odnosu na odgovaraju e kontrole za u prosjeku 107,0 sekundi ( 95% IP= od 7,82" do 142,2",  $P<0,001$ ).

U istoj vremenskoj to ki od 3 dana, Tlr2-/- fivotinje tako er reagiraju produljenjem latencije u odnosu na vlastite lafno operirane kontrole za u prosjeku 49 sekundi (95% IP=13,82" do 84,21",  $P<0,001$ ), no je jo–uvijek statisti ki zna ajno kra e odnosu na WT skupinu s MCAO i to u prosjeku za 54,2 sekunde (95% IP= 87,72" do 20,6",  $P<0,001$ ).

To navodi na zaklju ak da su aspekti akutne upale koji djeluju na reakciju na podraflaj dodira manje izrafleni kod mi–eva bez TLR2.

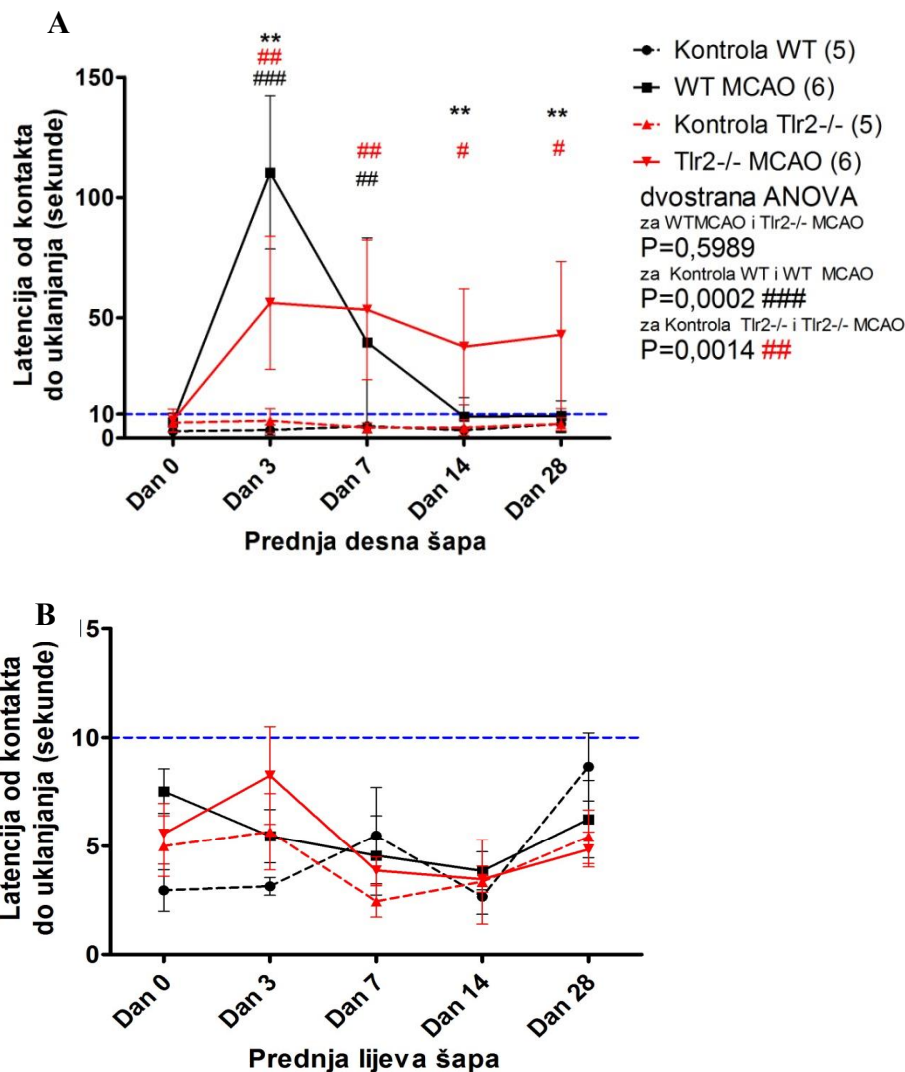
U subakutnoj vremenskoj to ki od 7 dana kod skupine WT s MCAO uo en je pad latencije u odnosu na prethodno mjerenje, no ona je jo–uvijek statisti ki zna ajno dulja u odnosu na lafno operirane kontrole i to u prosjeku za 34,93 sekunde ( 95%IP= -0,27" do 70,1",  $<0,01$ ).

U istoj vremenskoj to ki Tlr2-/- mi–evi s MCAO zadrflavaju otprilike isto vrijeme latencije kao i 3. dana i dalje se statisti ki izrazito zna ajno razlikuju od svojih lafno operiranih kontrola za u prosjeku 49 sekundi (95%IP= 13,92" do 84,31",  $IP<0,001$ ).

Uspore uju li se skupine mi–eva s MCAO razli itih genotipa, u ovoj vremenskoj to ki ne postoji statisti ki zna ajna razlika.

No trend opadanja latencije se i dalje nastavlja kod WT mi–eva s MCAO te razlika u odnosu na odgovaraju e kontrole 14. dan iznosi u prosjeku 5,3 sekundi, odnosno 3,3 sekunde 28. dana i nije statisti ki zna ajna.

Tlr2-/- mi–evi s MCAO pak odrflavaju statisti ki zna ajnu razliku u odnosu na vlastite kontrole i nadalje 14. dana u prosjeku 33,58 sekundi dulje (95% IP= -1,6" do 68,8",  $P<0,05$ ), te je potom 28. dana ponovno pove avaju u prosjeku 37 sekundi dulje (95% IP= 1,8" do 72,2",  $P<0,01$ ).



**Slika 31.** Vremena latencije od kontakta do uklanjanja naljepnice s prednje desne šape (A) i prednje lijeve šape (B) mjerila su se obostranim podražajem dodira i prikazana su u sekundama na dan 0 neposredno prije zahvata, te u vremenskim točkama 3, 7, 14 i 28 dana po zahvatu. Crno su označeni divlji tipovi (WT), a crveno Tlr2-/. Isprekidanom linijom su označene vrijednosti lažno operiranih kontrola, a punom linijom vrijednosti MCAO tretiranih životinja.

**Tablica 19.** Vremena latencije u sekundama prednje desne šape sa standardnom pogreškom po ispitivanim skupinama i vremenskim točkama. Prikazane su P vrijednosti za t-testove između pojedinih skupina unutar iste vremenske točke. Statistički značajne razlike istaknute su masno otisnutim podcrtanim P vrijednostima.

Latencija Vrijeme	Kontrola WT (5)	WT MCAO (6)	P za WT	Kontrola Tlr2-/- (5)	Tlr2-/- (6)	P za Tlr2-/-	P za WT MCAO vs Tlr2-/- MCAO
Dan 0	2,79± 0,43	6,54± 1,21	0,1124	6,33± 1,65	7,34± 1,61	0,5083	0,6136
Dan 3	3,35± 0,92	110,37± 13,01	<b>&lt;0,0001</b>	7,19± 2,29	56,20± 11,33	<b>0,0038</b>	<b>0,0105</b>
Dan 7	4,89± 0,67	39,82± 17,70	0,1081	4,22± 0,93	53,33± 11,88	<b>0,0047</b>	0,5403
Dan 14	3,24± 0,54	8,87± 3,25	0,1557	4,32± 1,46	37,91± 9,87	<b>0,0189</b>	<b>0,0189</b>
Dan 28	5,87± 1,60	9,18± 2,61	0,3318	5,85± 1,19	42,88± 12,47	<b>0,0253</b>	<b>0,0245</b>



Obzirom da WT MCAO skupina nakon akutnog porasta smanjuje latenciju, dok ona kod Tlr2-/- MCAO skupine raste blafte, ali se ne vraća na vrijednosti kontrola ni u kroničnoj vremenskoj točki, uo čene su statistički značajne razlike između u tih flivotinja u vidu dulje latencije kod Tlr2-/- MCAO miševa u prosjeku za 29 sekundi (95% IP=4,5" do 62,6", P<0,05) 14. dana, odnosno 33,7 sekundi (95% IP=0,14 do 67.2", P<0,01) 28. dana.

Takvi rezultati govore u prilog slabijem početnom osjetu dodira, no njegovom duljem perzistiranju bez TLR2, uključujući i detektirano pogoršanje u kroničnoj fazi mjesec dana nakon ishemije.

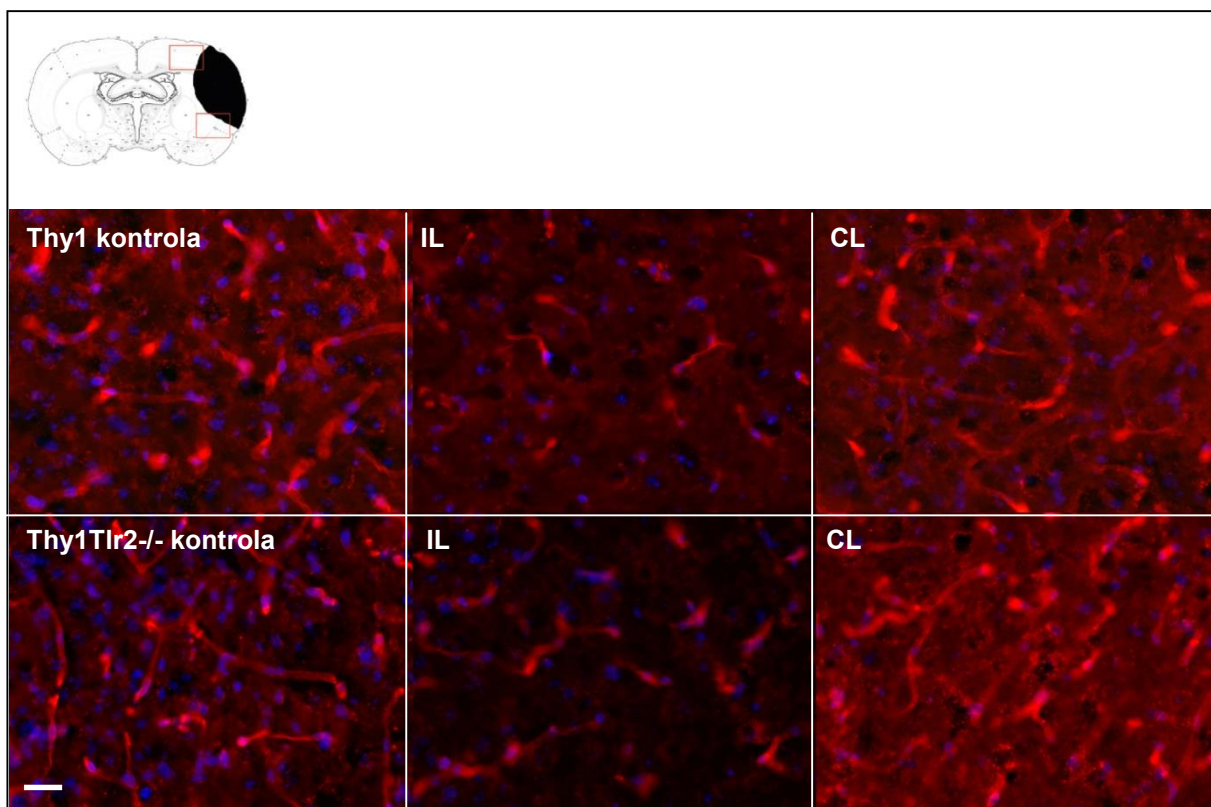
Promatrajući lijevu prednju nogu koja je ipsilateralna ud te je inervirana zdravim kontralateralnim korteksom, ne nalazi se statistički značajnih razlika i vremena latencije ostaju unutar prosječnih 10 sekundi (Slika 32.B).

### **5.3.Sporije sazrijevanje novih krvnih žila i manji broj njihovih grananja kod Tlr2-/- u odnosu na miševe divljeg tipa**

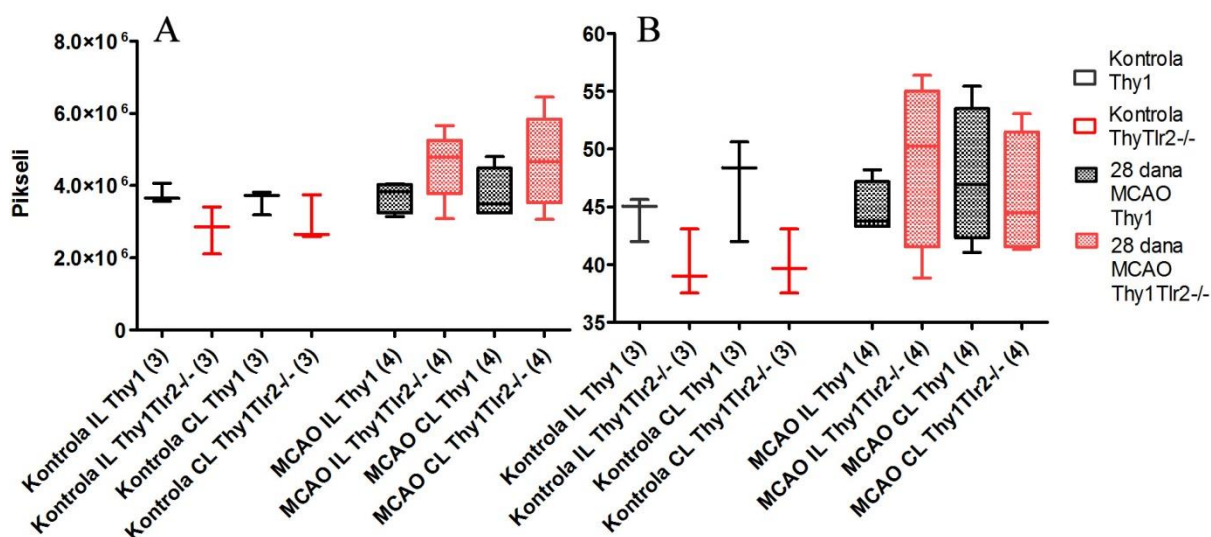
Obzirom da je izražaj TLR2 induciran u endotelnim stanicama u uvjetima upale, pristupilo se analizi krvnih žila moždane kore (102). Za mjerenje utjecaja nedostatka TLR2 u uspostavljanju funkcionalne i zrele mikrocirkulacije nakon ishemijskog početka u perilezionalnom području odabrana je kronična vremenska točka od 28 dana nakon MCAO (174).

Bojanje lektinom iz rajčice za krvne žile dalo je uvid u parametre mikrocirkulacije ishemijske moždane kore u odnosu na zdrave kontrole za oba genotipa (Slika 32.). Korišteni su rezovi tkiva Thy1 i Thy1Tlr2-/- miševa koji su kasnije poslužili za bojanje neurona i njihovih nastavaka, te se time smanjio broj flivotinja potrebnih za pokuse.

Iako smo primijetili da se ukupna površina i prosječna veličina krvnih žila u ipsilateralnoj i kontralateralnoj kori mozga nisu statistički značajno razlikovale između kontrolnih skupina te skupina s MCAO (Slika 32., Tablica 20.), broj bifurkacija te presjeka između žila i okomite rešetke u t-testu je pokazao statistički značajne razlike (Slike 34.,35. i 36.).



**Slika 32.** Reprerativne mikrofotografije fluorescentnog bojenja s lektinom rajčice (DyLight® Tomato Lectin), bojom za krvne žile (crveno) i DAPI, bojom za stanične jezgre (plavo) kod lažno operiranih kontrola za Thy1 (Thy1 kontrola) i Thy1Tlr2-/- miševa (Thy1Tlr2-/- kontrola), te njihove odgovarajuće ipsilateralne (IL) i kontralateralne (CL) hemisfere mjesec dana nakon MCAO. Crveni pravokutnici na shematskom prikazu označavaju perilezionalni korteks koji je uz homotopni kontralateralni korteks predstavljao područje analize. Mjerilo 50  $\mu\text{m}$ .



**Slika 33.** Ukupna površina (A) i prosječna veličina (B) krvnih žila mjerila se u pikselima kod Thy1 (Thy1 kontrola) i Thy1Tlr2-/- miševa (Thy1Tlr2-/- kontrola), te u odgovarajućim ipsilateralnim (IL) i kontralateralnim (CL) hemisferama mjesec dana nakon MCAO. Crveno su označene skupine s onemogućenim Tlr2-/-.

**Tablica 20.** Površina i promjeri krvnih žila sa standardnom pogreškom po ispitivanim skupinama i vremenskim točkama. Prikazane su P vrijednosti za t-testove između pojedinih skupina unutar iste vremenske točke (Mann-Whitney za 3 uzorka, Wilcoxon za vezane uzorke)

Površina (pikseli)	Thy1			Thy1Tlr2-/-			Thy1 vs Thy1Tlr2-/-
		P s IL 0	P IL28		P s IL0	P IL28	
Kontrola IL	3,76*10 <sup>6</sup> ± 154445	0,5	/ CL28	2,79*10 <sup>6</sup> ± 377788	0,5	/ CL28	0,0759
Kontrola CL	3,58*10 <sup>6</sup> ± 195936			2,99*10 <sup>6</sup> ± 375720			0,2412
MCAO IL	3,67*10 <sup>6</sup> ± 182844	0,7857	0,2213	4,57*10 <sup>6</sup> ± 419877	0,0714	0,8551	0,0841
MCAO CL	3,79*10 <sup>6</sup> ± 304422	0,7857		4,68*10 <sup>6</sup> ± 571255	0,0714		0,2056
Promjer (pikseli)							
		P s IL 0	P IL28		P s IL0	P IL28	
Kontrola IL	44,22± 1,128	0,5	/ CL28	39,88± 1,660	1	/ CL28	0,2
Kontrola CL	47± 2,587			40,10± 1,616			0,2
MCAO IL	44,75± 1,165	1	0,4402	48,93± 3,674	0,2286	0,4853	0,3195
MCAO CL	47,59± 2,976	0,4		45,84± 2,687	0,2286		0,6788

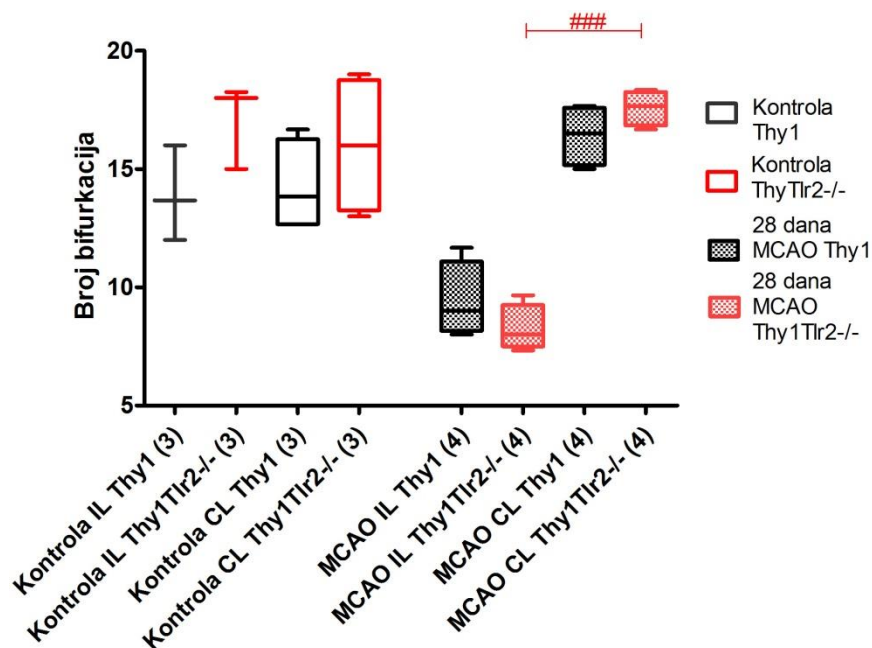
Prosječan broj granjanja krvnih žila (bifurkacija) po vidnom polju je kod Thy1 ukupno za obje hemisfere iznosio je 14,10 (SD=±1,813), odnosno 16,46 (SD=±2,4) kod Thy1Tlr2-/- miševa te nisu postojale statistički značajne razlike po etnog stanja uspoređivano dvostranim t-testom za nezavisne uzroke (P=0,0592) (Slika 34., Tablica 21.).

Daljnjom analizom broja bifurkacija t-testom za uzorke etna raspodjela nije parametrijska (Mann-Whitney) pokazalo se da ne postoje statistički značajne razlike u prosječnim vrijednostima između lijeve i desne hemisfere kod Thy1 miševa koje su divljeg tipa po pitanju ekspresije TLR2 (Thy1), ni kod Thy1Tlr2-/- miševa koje su bez TLR2, te da ne postoji razlika između prosječnog broja bifurkacija obzirom na genotip.

U skupini Thy1 miševa s MCAO mjesec dana nakon ishemijske lezije broj bifurkacija se smanjio u ipsilateralnoj hemisferi te je iznosio 9,4 (SD=±2,31), dok je u kontralateralnoj hemisferi lagano porastao na 16,42 (SD=±3). T-testom za vezane uzorke utvrđeno je statistički značajna razlika u obliku smanjenog broja bifurkacija zahvaćene hemisfere u odnosu na nezahvaćenu kod Thy1 miševa mjesec dana nakon MCAO (P=0,0129).

Thy1Tlr2-/- miševi s MCAO su u istoj vremenskoj točki imali izraženiji pad broja bifurkacija u hemisferi zahvaćenoj ishemijskom na prosječnu vrijednost od 8,25 (SD=±1,2).

Kontralateralna (desna) hemisfera je pokazala lagani porast broja bifurkacija s prosjekom od 17,6 (SD= $\pm$ 1,75), sli an reakciji kontralateralne hemisfere kod WT skupine. Zahvaljuju i tom kontralateranom porastu, a ipsilateralanom padu broja bifurkacija kod ThyTlr2<sup>-/-</sup> mi-eva postoji statisti ki zna ajno manji broj bifurkacija u ipsilateralnom korteksu u odnosu na kontralaterani s prosje nom razlikom od 9,33 (95% IP= od 8,034 do 10,63, P<0,0002). Uzimaju i u obzir Bonferronijevu korekciju za multiplicitet, u ovom se testu samo ta razlika pokazala kao statisti ki zna ajna.



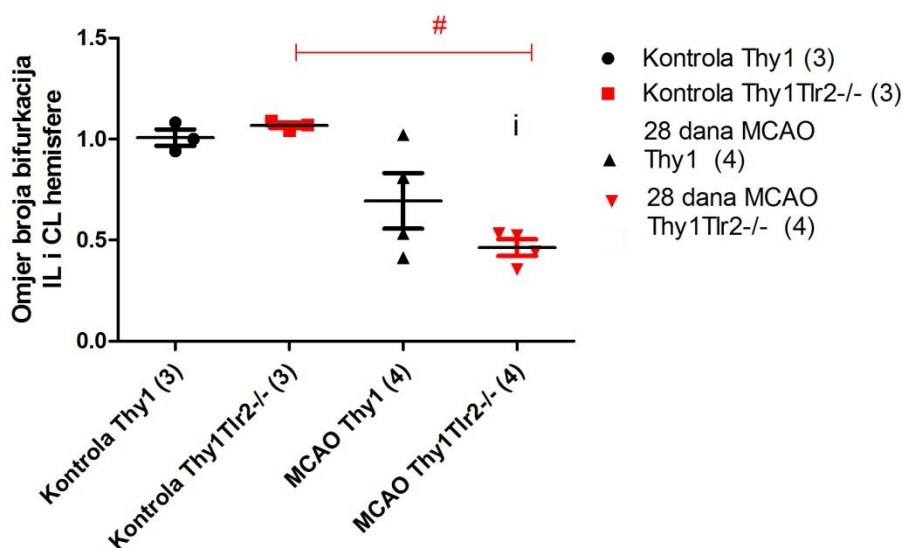
**Slika 34.** Broj bifurkacija krvnih žila u kori mozga kontrolnih miševa bez ishemije (Kontrola IL Thy1 i Kontrola IL Thy1Tlr2<sup>-/-</sup>, Kontrola CL Thy1 i Kontrola CL Thy1Tlr2<sup>-/-</sup>) te ipsilezionalnih (MCAO IL Thy1, MCAO IL Thy1Tlr2<sup>-/-</sup>) i kontralezionalnih kora mozga (MCAO CL Thy1, MCAO CL Thy1Tlr2<sup>-/-</sup>) 28 dana nakon MCAO. Crveno su označene skupine s onemogućenim TLR2.

**Tablica 21.** Broj bifurkacija krvnih žila sa standardnom pogreškom po ispitivanim skupinama i vremenskim točkama. Prikazane su P vrijednosti za t-testove između pojedinih skupina unutar iste vremenske točke (Mann-Whitney za skupine s 3 uzorka, Wilcoxon za vezane uzorke).

Broj bifurkacija	Thy1			Thy1Tlr2 <sup>-/-</sup>			Thy1 vs Thy1Tlr2 <sup>-/-</sup>
			P IL28		P s ILO	P IL28	
Kontrola IL	13,89 $\pm$ 1,160	1	/ CL28	17,08 $\pm$ 1,044	0,8845	/ CL28	0,2
Kontrola CL	14,25 $\pm$ 0,9754			16 $\pm$ 1,472			0,3094
MCAO IL	9,417 $\pm$ 0,7979	0,0571	<b>0,0129</b>	8,250 $\pm$ 0,4977	0,0571	<b>0,0002</b>	0,2610
MCAO CL	16,42 $\pm$ 0,6437	0,2286		17,58 $\pm$ 0,3696	1		0,1671

Stavljanjem u omjer prosje ni broj bifurkacija u ipsilateralnoj hemisferi s prosje nim brojem bifurkacija u kontralateralnoj hemisferi istog mi-a, pokazalo se kako je vrijednost prosje nog omjera broja bifurkacija mjesec dana nakon MCAO niža i kod Thy1 i kod Tlr2-/- flivotinja u odnosu na njihove kontrole skupine (Kontrola Thy1, Kontrola Thy1Tlr2-/-) (Slika 35., Tablica 22.).

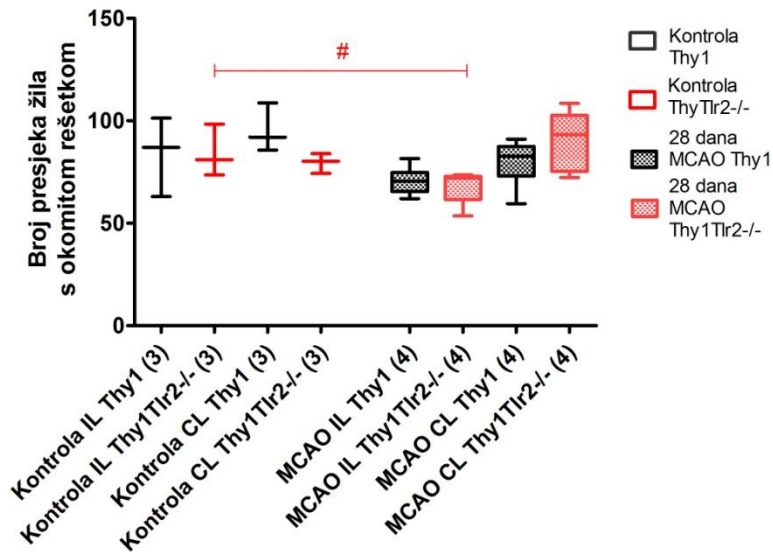
Zahvaljuju i ipsilateralnom padu, a kontralateralnom porastu broja bifurkacija, njihov omjer je mjesec dana nakon MCAO kod Thy1 mi-eva u prosjeku iznosio 69% (SD= $\pm$  27%), odnosno 46% (SD= $\pm$ 8%) kod Thy1Tlr2-/- mi-eva. K tome je taj omjer kod Thy1Tlr2-/- skupine statisti ki zna ajno niži od odgovaraju e kontrole (Kontrola Thy1Tlr2-/-) koja je blizu 100% (106%) i to u prosjeku za 60,5% (P=0,0286, jednosmerni t-test).



**Slika 35.** Omjer broja bifurkacija krvnih žila ipsi- i kontralateralne hemisfere kontrolnih miševa bez ishemije (Kontrola Thy1 i Kontrola Thy1Tlr2-/-) te s ishemijom (MCAO Thy1, MCAO Thy1Tlr2-/-) nakon 28 dana.

**Tablica 22.** Omjer broja bifurkacija krvnih žila sa standardnom pogreškom po ispitivanim skupinama i vremenskim točkama. Prikazane su P vrijednosti za t-testove između pojedinih skupina unutar iste vremenske točke (Mann-Whitney za skupine s 3 uzorka, Wilcoxon za vezane uzorke).

Omeri broja bifurkacija	Thy1	P Thy1	Thy1Tlr2-/-	P Thy1 Tlr2-/-	P Thy1 vs Thy1Tlr2-/-
Kontrola	1,008 $\pm$ 0,04076		1,068 $\pm$ 0,01395		0,4
MCAO (28 dana)	0,6941 $\pm$ 0,1374	0,1143	0,4633 $\pm$ 0,04127	<b>0,0286</b>	0,1589



**Slika 36.** Broj presjeka krvnih žila s okomitom rešetkom u kori mozga kontrolnih životinja bez ishemije (Kontrola IL Thy1, Kontrola IL Thy1Tlr2-/-, Kontrola CL Thy1 i Kontrola CLThy1Tlr2-/-) te ipsilezionalnih (MCAO IL Thy1, MCAO IL Thy1Tlr2-/-) i kontralezionalnih moždanih kora (MCAO CL Thy1, MCAO CL Thy1Tlr2-/-) 28 dana nakon MCAO. Crveno su označene skupine s onemogućenim TLR2.

**Tablica 23.** Broj presjeka krvnih žila i okomite rešetke u sa standardnom pogreškom po ispitivanim skupinama i vremenskim točkama. Prikazane su P vrijednosti za t-testove između pojedinih skupina unutar iste vremenske točke (Mann-Whitney za skupine s 3 uzorka, Wilcoxon za vezane uzorke).

Broj presjeka	Thy1			Thy1Tlr2-/-			Thy1 vs Thy1Tlr2-/-
	P s IL0	P IL28		P s IL0	P IL28		
Kontrola IL	83,75 ± 8,067	/	CL28	84,33 ± 7,313	/	CL28	1
Kontrola CL	95,44 ± 6,859			0,7871			79,53 ± 2,814
MCAO IL	70,80 ± 2,423	0,3833	0,2316	68,18 ± 3,723	<b>0,0357</b>		0,5511
MCAO CL	79,92 ± 4,493	0,3240		89,82 ± 6,513	1		0,0911

Promatraju i broj presjeka krvnih žila i okomite rešetke dobiven je pokazatelj izvijuganosti krvne mreže koja posredno opisuje angiogenezu i sazrijevanje, obzirom da su mala i krvna žila veći faktori izvijuganosti (Slika 36., Tablica 23.).

Prosječni broj presjeka kod miševa Thy1 genotipa bio je 97,08 ± 5,067 po mikrofotografiji korteksa, odnosno 84,33 ± 7,313 kod Thy1Tlr2-/- miševa.

T-testom za uzorke koji ne zadovoljavaju uvjet normalne raspodjele (Mann-Whitney) pokazalo se da za p-četne vrijednosti lijeve i desne hemisfere nisu postojale statistički značajne razlike između genotipova.

Kod Thy1 divljeg tipa za *Tlr2* postoji statistički značajno manji broj presjeka u ipsilateralnoj hemisferi nakon mjesec dana u usporedbi s kontrolom. Prosječna vrijednost je iznosila  $70,80 \pm 2,423$ .

Broj presjeka za Thy1Tlr2<sup>-/-</sup> miševa je mjesec dana nakon ishemije u ipsilateralnoj hemisferi iznosio  $68,18 \pm 3,723$ , je također bio statistički značajno smanjen u odnosu na kontrolu.

Prilikom usporedbe kontralateralne i ipsilateralne hemisfere mjesec dana nakon ishemije ne postoji statistički značajna razlika za oba genotipa.

Kontralateralne hemisfere su održale svoj broj presjeka i mjesec dana nakon ishemije kod oba genotipa.

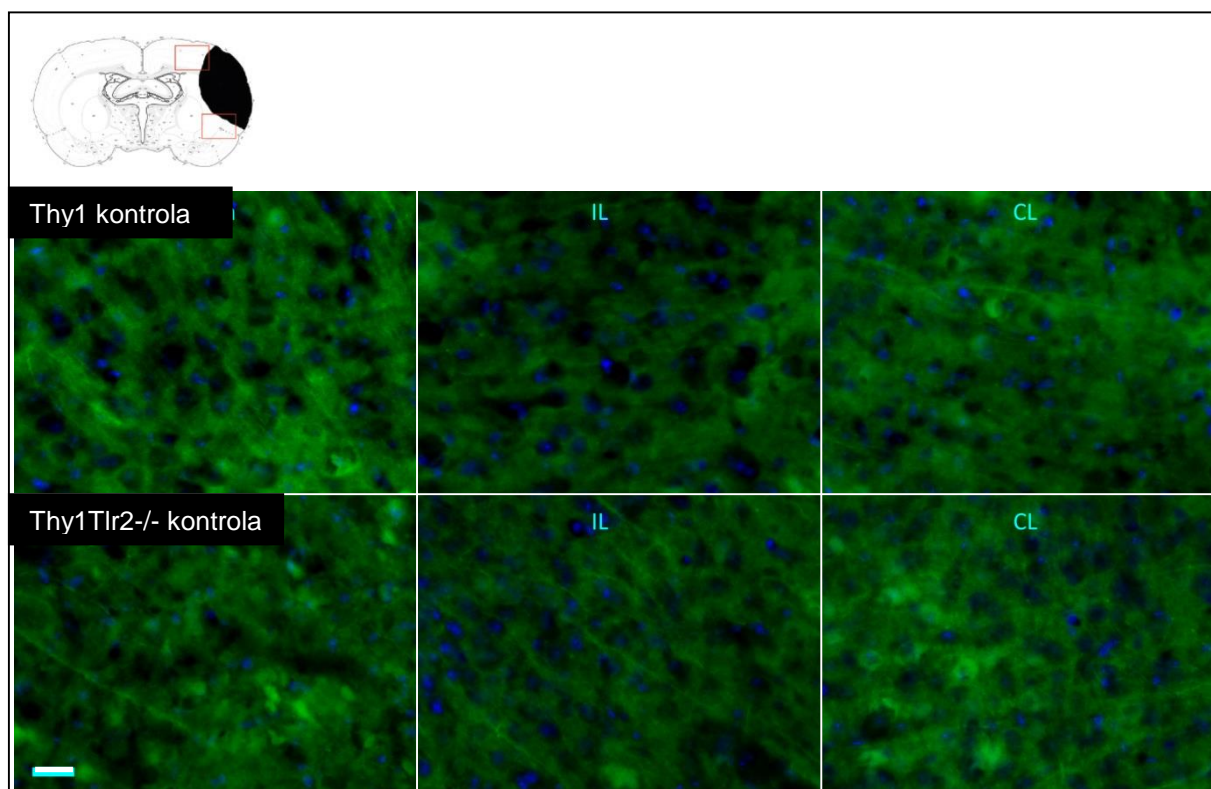
Takav rezultat ukazuje na smanjenje izvijuganosti krvnih žila nakon ishemije kod miševa koji ne posjeduju TLR2. Kako je izvijuganost pokazatelj novih krvnih žila, te obzirom da je broj bifurkacija kod Thy1Tlr2<sup>-/-</sup> miševa manji, moguće je zaključiti kako su kod miševa koji posjeduju TLR2 nakon mjesec dana žile već sazrele i razgranale se, dok se kod flivotinja kojima nedostaje TLR2 taj proces sporije odvija.



#### 5.4. Izrazitija asimetrija neuralne mreže mjesec dana nakon MCAO kod Tlr2<sup>-/-</sup> u odnosu na miševе divljeg tipa

Obzirom da Thy1 mi-evi izraflavaju YFP u visokoj mjeri u neuronima, njihovim tijelima i ograncima (dendritima i aksonima), pokazali su se kao idealan model za prouavanje funkcionalne neuronske mreže. (Vidi Poglavlje 3.2.4 Linija mi-eva B6.-Tg[Thy1-YFP]16Jrs/J) (157).

Mjerila se optička gustoća ipsilateralne i kontralateralne hemisfere kontrolnih flivotinja te Thy1 i Thy1Tlr2<sup>-/-</sup> flivotinja 1 mjesec nakon MCAO (Slika 37.), te su analizirani omjeri IOD-a za YFP ipsilateralne i kontralateralne hemisfere po flivotinji.



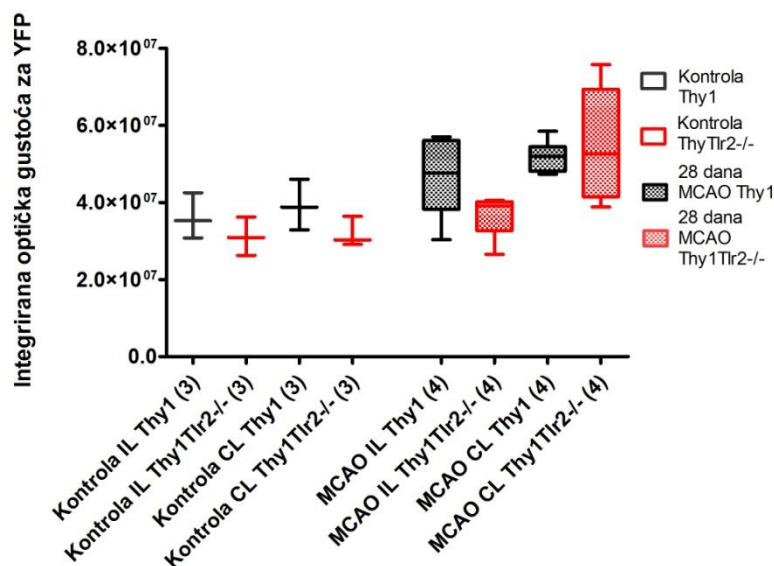
**Slika 37.** Reprerentativne mikrofotografije fluorescencije žute fluorescentne bjelančevine (YFP, zeleno) i DAPI bojanja staničnih jezgara (plavo), kod lažno operiranih kontrola za Thy1 (Thy1 kontrola) i Thy1Tlr2<sup>-/-</sup> miševе (Thy1Tlr2<sup>-/-</sup> kontrola), te njihove odgovarajuće ipsilateralne (IL) i kontralateralne (CL) hemisfere mjesec dana nakon MCAO. Crveni pravokutnici na shematskom prikazu označavaju perilezionalni korteks koji je uz homotopni kontralateralni korteks predstavljao područje analize. Mjerilo 50  $\mu$ m.



Po etna prosje na vrijednost IOD-a za YFP je bila ne-to ni fla kod Thy1Tlr2-/- mi-eva (3,1\*10<sup>7</sup> ipsilateralno; 3,2\*10<sup>7</sup> kontralateralno) u odnosu na Thy1 skupinu (3,6\*10<sup>7</sup> ipsilateralno; 3,9\*10<sup>7</sup> kontralateralno). Obzirom da te skupine sadrfe po 3 uzorka, u njihovim se daljnjim statisti kim usporedbama koristio neparametrijski Mann-Whitney test.

Mjesec dana nakon ishemijskog o-te enja analiziralo se kona no stabilno stanje neuronske mreffe uspostavljeno nakon zavr-enog razdoblja akutnih i subakutnih intenzivnih zbivanja upale i pregradnje (nicanje i uklanjanje aksona) (174).

Dok je kod divljeg tipa uo eno blago i simetri no pove anje IOD-a YFP-a u kroni noj vremenoj to ki od 28 dana (4,7\*10<sup>7</sup> ipsilateralno; 5,2\*10<sup>7</sup> kontralateralno), kod mi-eva bez funkcionalnog TLR2 navedeni parametar ostaje na po etnoj razini u ipsilateralnoj hemisferi (3,6\*10<sup>7</sup> ipsilateralno), dok se u kontralateralnoj hemisferi pove ava i iznad razina uo enih kod mi-eva divljeg tipa (5,5\*10<sup>7</sup> kontralateralno), no nisu prona ene statisti ki zna ajne razlike (Slika 38.).

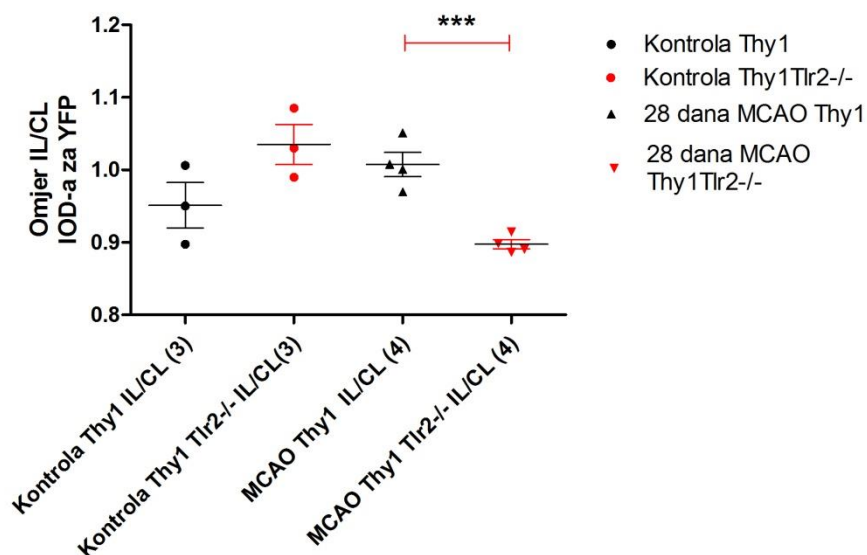


**Slika 38.** Izmjerene vrijednosti IOD-a za YFP u kori mozga kontrolnih životinja bez ishemije (Kontrola Thy1 IL/CL i Kontrola Thy1Tlr2-/- IL/CL) te životinja tretiranih s MCAO (MCAO Thy1 IL/CL, MCAO Thy1Tlr2-/-IL/CL) 28 dana nakon ishemijskog oštećenja. Crveno su označene skupine s onemogućenim TLR2.

Kako bi se istraffila navedena asimetrija hemisfera uo ena kod Tlr2-/-, u me usobni su omjer stavljeni parovi prosje nih vrijednosti za pojedinu flivotinju.

Dobiveni omjer IOD-a YFP-a kore mozga ipsilateralne (IL) i kontralateralne (CL) hemisfere se statisti ki izrazito zna ajno razlikovao izme u Thy1 i Thy1Tlr2-/- flivotinja 1 mjesec nakon MCAO, gdje je omjer u odsustvu TLR2 bio ni ffi u prosjeku za 11% (95% IP=6,6% do 15,4%, P=0,0008. T-test za nesporene uzorke) (Slika 39., Tablica 24).

To govori u prilog znatne asimetrije gustoće neuronske mreže između zahvaćene i kontralateralne hemisfere koja nastupa u odsustvu TLR2. Kod divljeg tipa omjeri IOD-a ipsilateralne i kontralateralne hemisfere ostaju blizu vrijednosti 1, te se ne razlikuju od vrijednosti kontrola (Slika 39.).



**Slika 39.** Omjeri IOD-a za YFP korteksa ipsi- i kontralateralnih hemisfera kontrolnih miševa bez ishemije (Kontrola Thy1 IL/CL i Kontrola Thy1Tlr2-/- IL/CL) te životinja tretiranih s MCAO (MCAO Thy1 IL/CL, MCAO Thy1Tlr2-/-IL/CL) 28 dana nakon ishemijskog oštećenja. Crveno su označene skupine s onemogućenim TLR2.

**Tablica 24.** Omjer IOD-a za YFP korsteksa ipsi- i kontralateralnih hemisfera miševa standardnom pogreškom po ispitivanim skupinama i vremenskim točkama. Prikazane su P vrijednosti za t-testove između pojedinih skupina unutar iste vremenske točke (Mann-Whitney za skupine s 3 uzorka).

Omeri IOD-a za YFP	Thy1	P Thy1	Thy1Tlr2-/-	P Thy1 Tlr2-/-	P Thy1 vs Ty1Tlr2-/-
Kontrola	0,9513 ± 0,0313	0,2286	1,035 ± 0,0276	0,0571	0,2
MCAO (28 dana)	1,007 ± 0,0168		0,8974 ± 0,0161		<b>0,0008</b>

## 5.5. Izražaj gena uključenih u signalni put TLR2

Kako bi se istražio izražaj mRNA gena uključenih u signalni put TLR2 u akutnoj, subakutnoj i kroničnoj fazi oporavka od MCAO, izolirane su moždane polutke miševa neposredno prije, 72 sata, 1 tjedan te mjesec dana nakon ishemijskog oštećenja. Pomoću TaqMan® testova za izražaj gena kvantitativnim real-time PCR-om reverzne transkriptaze istražene su razine mRNA kod Tlr2<sup>-/-</sup> i WT miševa.

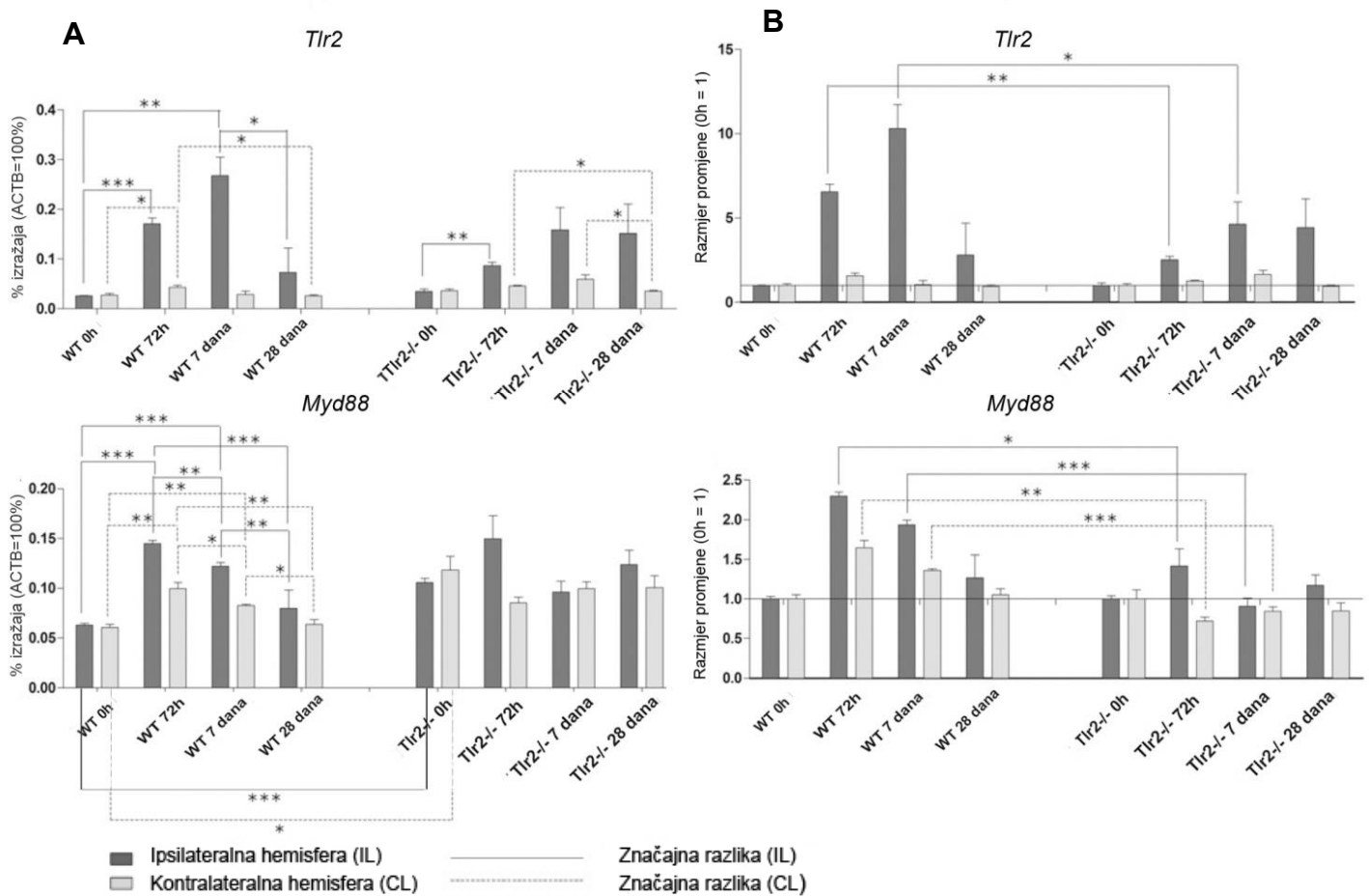
### 5.5.1. Sporiji porast izražaja *Tlr2* nakon ishemijskog oštećenja kod Tlr2<sup>-/-</sup> u odnosu na miševe divljeg tipa

Kako bi se procijenio izražaj TLR2 kao receptora koji započinje signalnu kaskadu, kod Tlr2<sup>-/-</sup> miševa koristila se skraćena mRNA za *Tlr2*. Koristio se dio mRNA gena *Tlr2* koji nije bio zahvaćen tijekom postupka stvaranja Tlr2<sup>-/-</sup> onemogućenog miša (knock-out), kako bi se iste sekvence mogle koristiti za kvantitativni PCR kod oba genotipa (WT, Tlr2<sup>-/-</sup>). Na takav način bilo je moguće pratiti razinu izražaja *Tlr2* te u kakvom je odnosu obzirom na prisutnost/odsutstvo bjelančevine TLR2.

Izražaj skraćene *Tlr2* mRNA Tlr2 72 sata nakon MCAO se značajno povećao u svim ispitivanim uzorcima, osim u kontralateralnoj hemisferi Tlr2<sup>-/-</sup> miševa (Slika 40.). Visoke razine skraćene *Tlr2* mRNA bile su prisutne i tjedan dana nakon MCAO te su se potom značajno smanjile u vremenskoj točki od mjesec dana u svim uzorcima osim u ipsilateralnoj hemisferi Tlr2<sup>-/-</sup> gdje su bile prisutne i nadalje.

Uspoređujući i WT i Tlr2<sup>-/-</sup> miševa, uočeno je znatno viši izražaj skraćene mRNA *Tlr2*, nego li kod Tlr2<sup>-/-</sup> 72 sata i 7 dana nakon ishemijskog oštećenja.

To navodi na zaključak kako je izražaj *Tlr2* potaknut nakon MCAO, a nakon tjedan dana se snižava. Nedostatak funkcionalne bjelančevine dovodi do slabijeg i sporijeg odgovora, no visoke razine *Tlr2* mRNA ostaju prisutne i do mjesec dana.



**Slika 40.** Razine izražaja skraćene mRNA za *Tlr2* i mRNA za *Myd88*. Podaci su prikazani na 2 načina: A) razine mRNA svakog gena su prikazane kao postotak u odnosu na razine izražaja endogene kontrole (*Actb*) i B) podaci svake hemisfere u određenoj vremenskoj točki su normalizirani na vrijednosti kontrole (kontrola = 1). Razlike među hemisferama su bile statistički značajne ako je  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) i  $p < 0,005$  (\*\*\*)

Gen *Myd88* kodira adaptor koji je potreban za započinjanje signalnog puta TLR2. Kod divljih tipova izražaj *Myd88* na razini mRNA je bio povećan u obje moždane hemisfere, pokazujući najvišu razinu 72h nakon MCAO, a potom se postupno smanjivao na razine kontrole 1 mjesec nakon MCAO. *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševi nisu pokazali značajnu promjenu u izražaju *Myd88* mRNA ni u jednoj hemisferi (Slika 40.).

Postetna razina *Myd88* kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> koja se koristila kao kontrola bila je znatno viša od početne razine kod divljeg tipa.

Kod miševa koji imaju funkcionalan TLR2, izražaj *Myd88* je potaknut u ranim fazama oporavka nakon ishemijske lezije. Ukoliko TLR2 nije prisutan, postetno postoji obilniji rezervoar *Myd88* mRNA, no sam odgovor na ishemijsku leziju nije značajan.

### 5.5.2. Jači izražaj gena signalnog puta TLR2 nakon ishemijskog oštećenja kod Tlr2<sup>-/-</sup> u odnosu na miševe divljeg tipa

Kako bi se istraffio izraflaj gena uklju enih u signalni put TLR2, uz mRNA *Tlr2* i *MyD88*, odre ivale su se razine mRNA gena *Irak1*, *Irak4*, *Ikkkb*, *Irak3*, *Tollip*, *Nfkb1a* i *Nfkb1* (Slika 41.).

Izraflaj mRNA *Irak1* gena se smanjio 72 sata nakon ishemije kod oba genotipa i potom se postupno vratio na po etne kontrolne vrijednosti mjesec dana nakon MCAO. Kontralateralna hemisfera nije pokazivala promjene u izraflaju mRNA za *Irak1* kod mi-eva divljeg tipa.

Kao i za *Myd88*, Tlr2<sup>-/-</sup> mi-evi imali su pove anu bazalnu razinu mRNA za *Irak1* te je pad izraflaja 72 sata nakon MCAO bio izrafleniji u odnosu na WT mi-eve.

*Irak1* je stoga uti-an tijekom rane faze oporavka, a neaktivni Tlr2 pove ava njegovu bazalnu razinu i dovodi do strmijeg pada uslijed postishemijskog uti-avanja.

Izraflaj mRNA *Irak4* gena se povisio u ipsilateralnim hemisferama kod oba genotipa nakon ishemijske lezije. Kontralateralna hemisfera kod divljeg tipa nije pokazivala promjene, dok je u kontralateralnoj hemisferi Tlr2<sup>-/-</sup> mi-eva nastupilo uti-avanje *Irak4*.

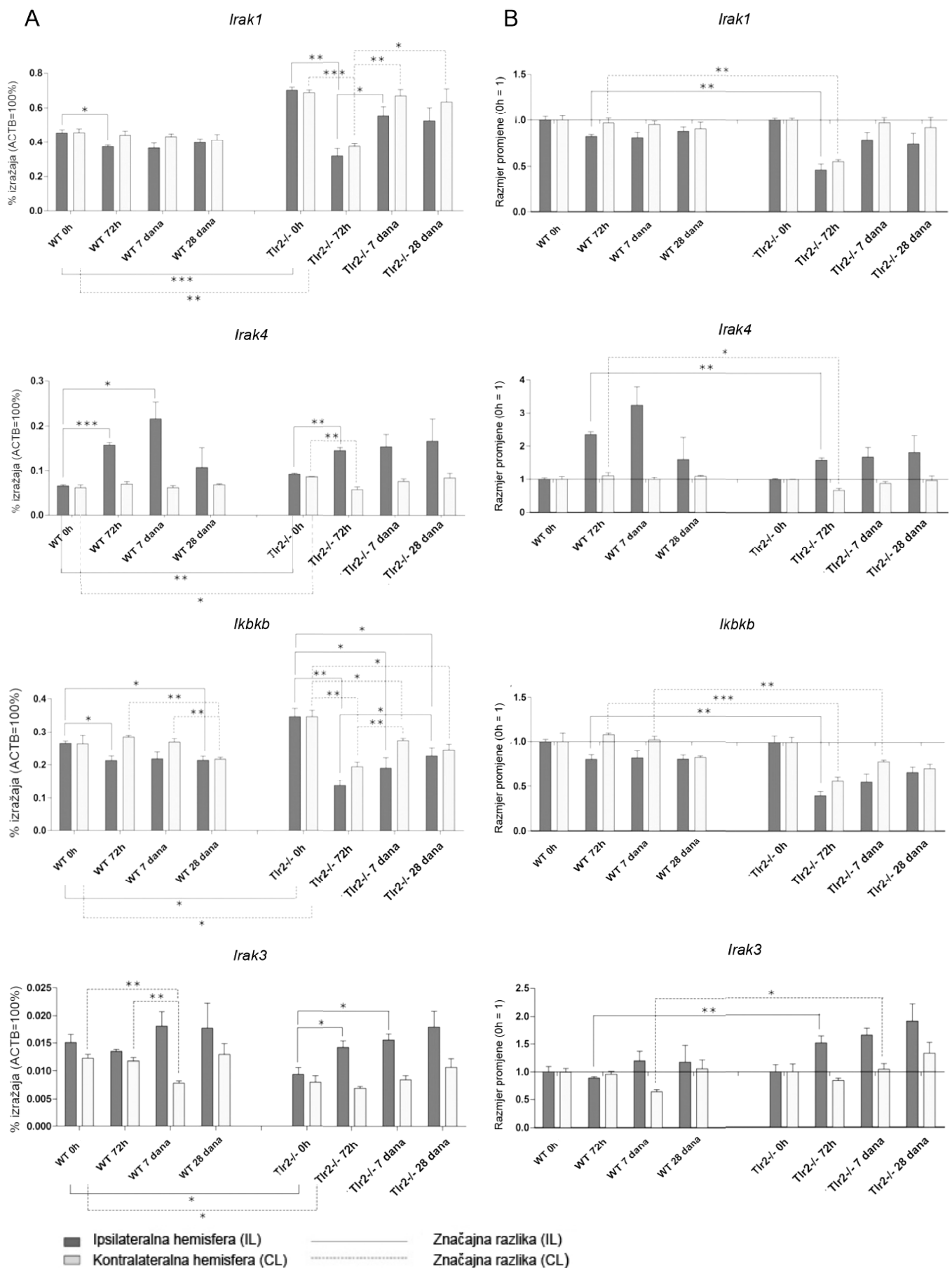
Tlr2<sup>-/-</sup> mi-evi su imali, kao i za *Myd88* i *Irak1*, zna ajno ve i rezervoar *Irak4* mRNA, no i znatno slabiji ekspresijski odgovor za *Irak4* u obje hemisfere 72 sata nakon MCAO.

Stoga je opravdan zaklju ak kako je izraflaj *Irak4* mRNA poja an nakon MCAO, dok neaktivan *Tlr2* pove ava po etnu razinu mRNA za *Irak4*, te k tome njegovo poja avanje nakon ishemijskog o-te enja nije izrazito kao kod divljeg tipa.

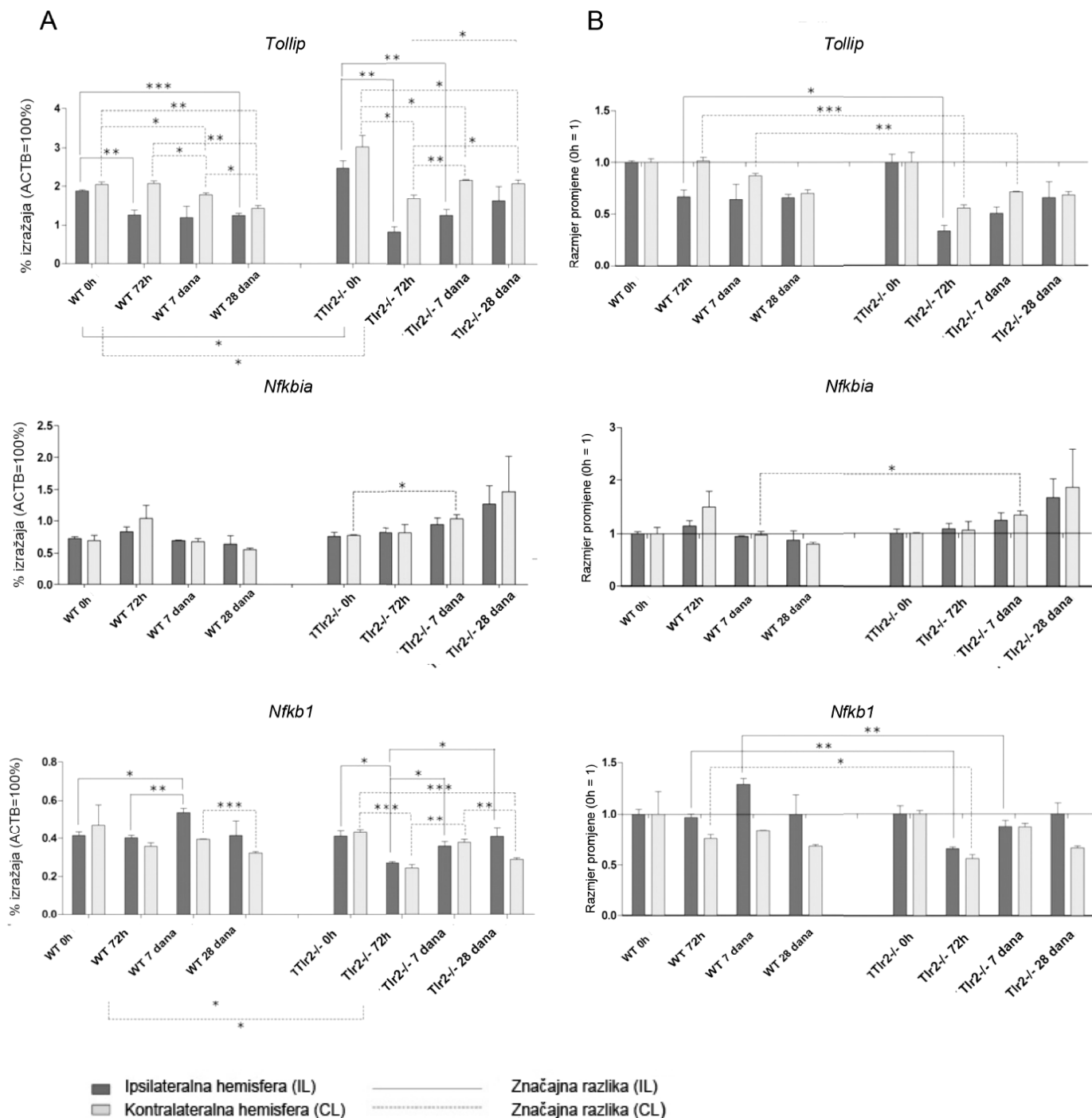
*Ikkkb* se smatra aktivatorom signalnog puta TLR2 jer njegov inhibitor inhibira *Nfkb1*. Izraflaj *Ikkkb* se smanjio 72 sata nakon ishemije kod oba genotipa, no kod Tlr2<sup>-/-</sup> su se kasnije postupno pove avale, dok je kod divljeg tipa gen ostao uti-an.

Prema tome, *Ikkb* je uti-an tijekom kroni ne faze oporavka, a u slu aju nedostatka funkcionalnog TLR2 postoji konstitutivno poja ani izraflaj te izrazitije uti-avanje nakon ishemije.

Kod Tlr2<sup>-/-</sup> je pove ana po etna razina mRNA *Ikkkb*, ali je i pad izraflaja znatniji u vremenskoj to ki od 72 sata.



**Slika 41.** Razine izražaja *Irak1*, *Irak4*, *Ikbkb* i *Irak3*. Podaci su prikazani na 2 načina: A) razine mRNA svakog gena su prikazane kao postotak u odnosu na razine izražaja endogene kontrole (*Actb*) i B) podaci svake hemisfere u određenoj vremenskoj točki su normalizirani na vrijednosti kontrole (kontrola = 1). Razlike među hemisferama su bile statistički značajne ako je  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) i  $p < 0,005$  (\*\*\*)



**Slika 42.** Razine izražaja mRNA za *Tollip*, *Nfkbia* i *Nfkb1*. Podaci su prikazani na 2 načina: A) razine mRNA svakog gena su prikazane kao postotak u odnosu na razine izražaja endogene kontrole (*Actb*) i B) podaci svake hemisfere u određenoj vremenskoj točki su normalizirani na vrijednosti kontrole (kontrola = 1). Razlike među hemisferama su bile statistički značajne ako je  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) i  $p < 0,005$  (\*\*\*).

Izražaj mRNA za *Irak3* se nije promijenio u ipsilateralnoj hemisferi WT mi-eva. U kontralateralnoj hemisferi se *Irak3* uti-ao do tjedan dana nakon ishemije. Kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> mi-eva kontralateralna hemisfera nije pokazala nikakvih promjena, dok je u ipsilateralnoj hemisferi do-ao do pove-anog izražaja do tjedan dana nakon ishemije.

Početna razina mRNA za *Irak3* je kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> bila niska u odnosu na razine kod divljeg tipa, a izražaj je bio pojačan u ipsilateralnoj hemisferi 72 sata, odnosno u kontralateralnoj hemisferi 7 dana nakon MCAO.

Nedostatak funkcionalnog *Tlr2* dovodi do smanjenja konstitutivnog izražaja mRNA za *Irak3*, a reaktivnog pojačavanja nakon MCAO. Kod divljeg tipa dolazi do utišavanja gena za *Irak3* u kroničnoj fazi nakon ishemije.

Izražaj mRNA za *Tollip* smanjio se u obje hemisfere WT miševa, osobito mjesec dana nakon MCAO kad postigne i najnižu razinu (Slika 43). Kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa je izražaj mRNA za *Tollip* utišavan u obje hemisfere 72 sata nakon ishemije, te se potom postupno povećavao do početne razine.

U usporedbi s divljim tipom, kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa se pokazalo izrazitije utišavanje gena za *Tollip* 72 sata nakon MCAO u obje hemisfere, te tjedan dana nakon MCAO u kontralateralnoj hemisferi. Početna razina izražaja *Tollip* gena bila je povećana kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa.

Stoga se može zaključiti kako je *Tollip* utišavan nakon ishemijske lezije. Neaktivni *Tlr2* dovodi do povećanog rezervoara mRNA za *Tollip*, te uslijed nastupa ishemije dolazi to znatnog utišavanja njegovog izražaja.

Izražaj mRNA za *Nfkb1* se nije promijenio u obje hemisfere divljeg tipa, ni kod ipsilateralne hemisfere *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa, no u njihovoj se kontralateralnoj hemisferi povisio tjedan dana nakon ishemijske lezije te je pri tom taj porast bio statistički značajan u usporedbi s odgovarajućim vrijednostima divljeg tipa (Slika 42.).

Regulacija *Nfkb1* se nije znatno promijenila nakon MCAO, no postoji trend povećanja u kontralateralnoj hemisferi *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa tijekom kronične faze oporavka.

Izražaj mRNA za *Nfkb1* se povećao u ipsilateralnoj hemisferi WT miševa tjedan dana nakon MCAO, a smanjio nakon mjesec dana (Slika 42).

Kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa izražaj *Nfkb1* se smanjio u obje hemisfere 72 sata nakon MCAO te potom postupno vratio na početnu razinu u vremenskoj točki od mjesec dana.

*Tlr2*<sup>-/-</sup> miševi imaju značajno niže razine mRNA za *Nfkb1* u obje hemisfere 72 sata, te u ipsilateralnoj hemisferi tjedan dana nakon ishemijske lezije.

Odgovor na ishemiju u regulaciji *Nfkb1* bio je vidljiv samo u kroničnoj fazi oporavka. Neaktivan *Tlr2* nije doveo do pojačavanja izražaja *Nfkb1*, već naprotiv, njegove su razine izražaja bile znatno niže u usporedbi s WT skupinom.



### 5.5.3. Odgovor pojačavanja izražaja gena za *Tnf* je smanjen kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> u odnosu na miševu divljeg tipa

S ciljem analize citokina koji su povezani sa signalnim putem TLR2, određivale su se razine *Tnf*, *Il6* i *Il1b*, zajedno s *Casp1* koja je aktivator *Il1b* (Slika 44.).

Izražaj mRNA za *Tnf* je bio slično pojačan u ipsilateralnoj hemisferi oba genotipa 72 sata nakon MCAO. U kontralateralnim hemisferama pojačanje izražaja je bilo slabije, ali još uvijek znatno kod divljeg tipa.

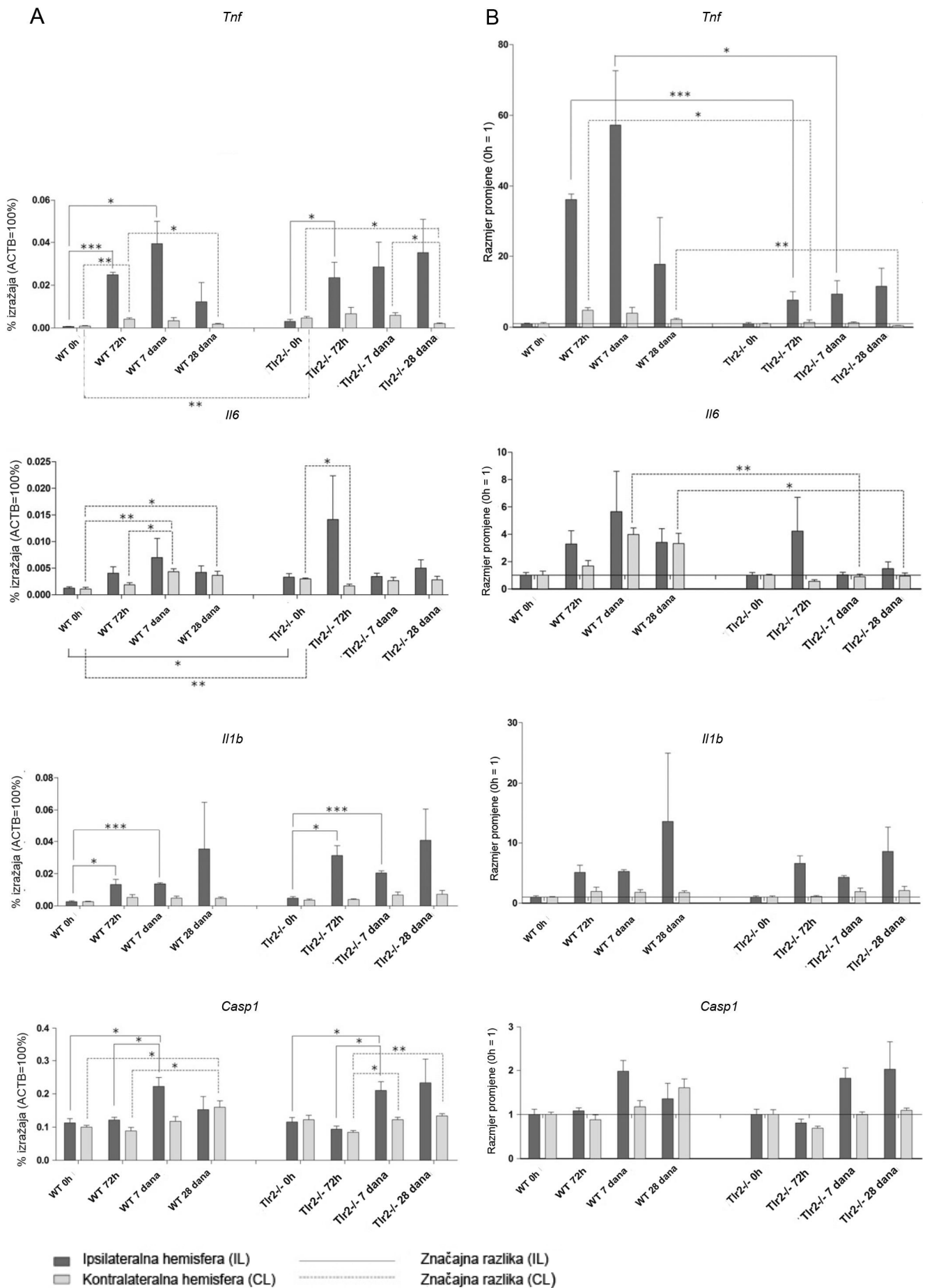
*Tlr2*<sup>-/-</sup> skupina je u usporedbi s WT pokazala znatno manje povećanje izražaja mRNA za *Tnf* u obje hemisfere 72 sata nakon MCAO. Pri tom je početna razina mRNA za *Tnf* bila povećana kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa.

Izražaj *Tnf*-a je pojačan tijekom kronične faze oporavka, a neaktivni *Tlr2* dovodi do povećanja rezervoara mRNA za *Tnf*, te umanjuje pojačanje signala nakon ishemijske lezije.

Izražaj mRNA za *Il6* nije se promijenio u ipsilateralnoj hemisferi oba genotipa nakon MCAO. U kontralateralnoj hemisferi divljeg tipa pojačao se u vremenskoj točki od 7 dana i ostao na toj razini do kronične vremenske točke od mjesec dana. Kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa je nastupilo utišavanje *Il6* u kontralateralnoj hemisferi 72 sata nakon MCAO.

Kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa početno postoji znatno veća količina mRNA za *Il6*, a nakon MCAO ne dolazi do porasta u kontralateralnoj hemisferi te su razine znatno niže u vremenskim točkama 7 i 28. dana.

Nakon MCAO došlo je do pojačanog izražaja mRNA za *Il1b* u ipsilateralnim hemisferama oba genotipa, dok kontralateralna hemisfera nije pokazivala promjene. *Casp1* se pojačao u obje hemisfere oba genotipa, te kao i kod *Il1b* nije uočena razlika u regulaciji tog gena nakon MCAO.



**Slika 43.** Razine izražaja *Tnf*, *Il6*, *Il1b*, i *Casp1*. Podaci su prikazani na 2 načina: A) razine mRNA svakog gena su prikazane kao postotak u odnosu na razine izražaja endogene kontrole (*Actb*) i B) podaci svake hemisfere u određenoj vremenskoj točki su normalizirani na vrijednosti kontrole (kontrola = 1). Razlike među hemisferama su bile statistički značajne ako je  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) i  $p < 0,005$  (\*\*\*)

#### 5.5.4. Pojačani izražaj *Casp8* kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> u odnosu na miševe divljeg tipa

Kako bi se obuhvatili proapoptotički geni povezani sa signalnim putem TLR2, određivale su se razine mRNA za *Casp8* i *Fadd* (Slika 45.).

Kod divljeg tipa u ipsilateralnoj hemisferi dolazi do značajnog povećanja izražaja *Casp8* 72 sata i tjedan dana nakon MCAO. U kontralateralnoj se hemisferi značajno povećava tjedan dana i 1 mjesec nakon ishemijske lezije.

Kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> je došlo do značajnog povećanja izražaja *Casp8* u obje hemisfere postiflu i vrhunac 7 dana nakon MCAO. U usporedbi s WT skupinom, u vremenskoj točki od tjedan dana *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševi imaju značajno veći izražaj *Casp8* u obje hemisfere, dok u vremenskoj točki od mjesec dana u kontralateralnoj hemisferi imaju značajno manji izražaj istog gena.

Početna razina *Casp8* kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> je značajno povećana kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa.

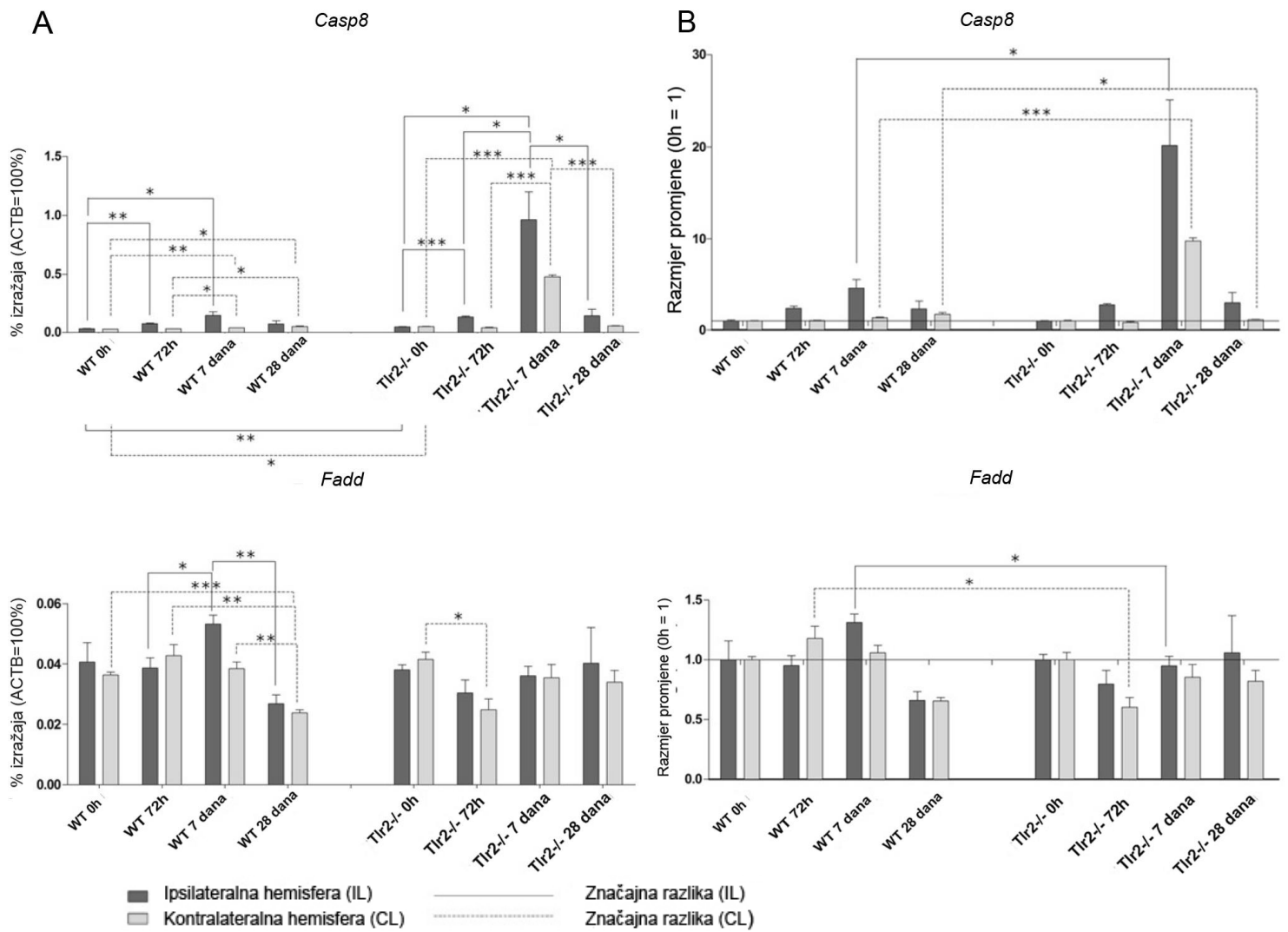
Neaktivan *Tlr2* dovodi do povećanog rezervoara *Casp8* u mirovanju, ali i do značajnog povećanja izražaja u subakutnoj fazi oporavka.

Izražaj mRNA za *Fadd* se značajno povećao kod WT u ipsilateralnoj hemisferi tjedan dana nakon MCAO i potom je značajno utišan u vremenskoj točki od mjesec dana. U kontralateralnoj hemisferi divljeg tipa, *Fadd* se znatno utišao nakon mjesec dana.

Kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa nije bilo promjene u izražaju *Fadd* u ipsilateralnoj hemisferi, ali je 72 sata nakon MCAO u kontralateralnoj hemisferi nastupilo značajno utišavanje.

U usporedbi s WT, *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševi su imali značajno niže razine mRNA za *Fadd* u ipsilateralnoj hemisferi tjedan dana, te u kontralateralnoj hemisferi 72 sata nakon MCAO.

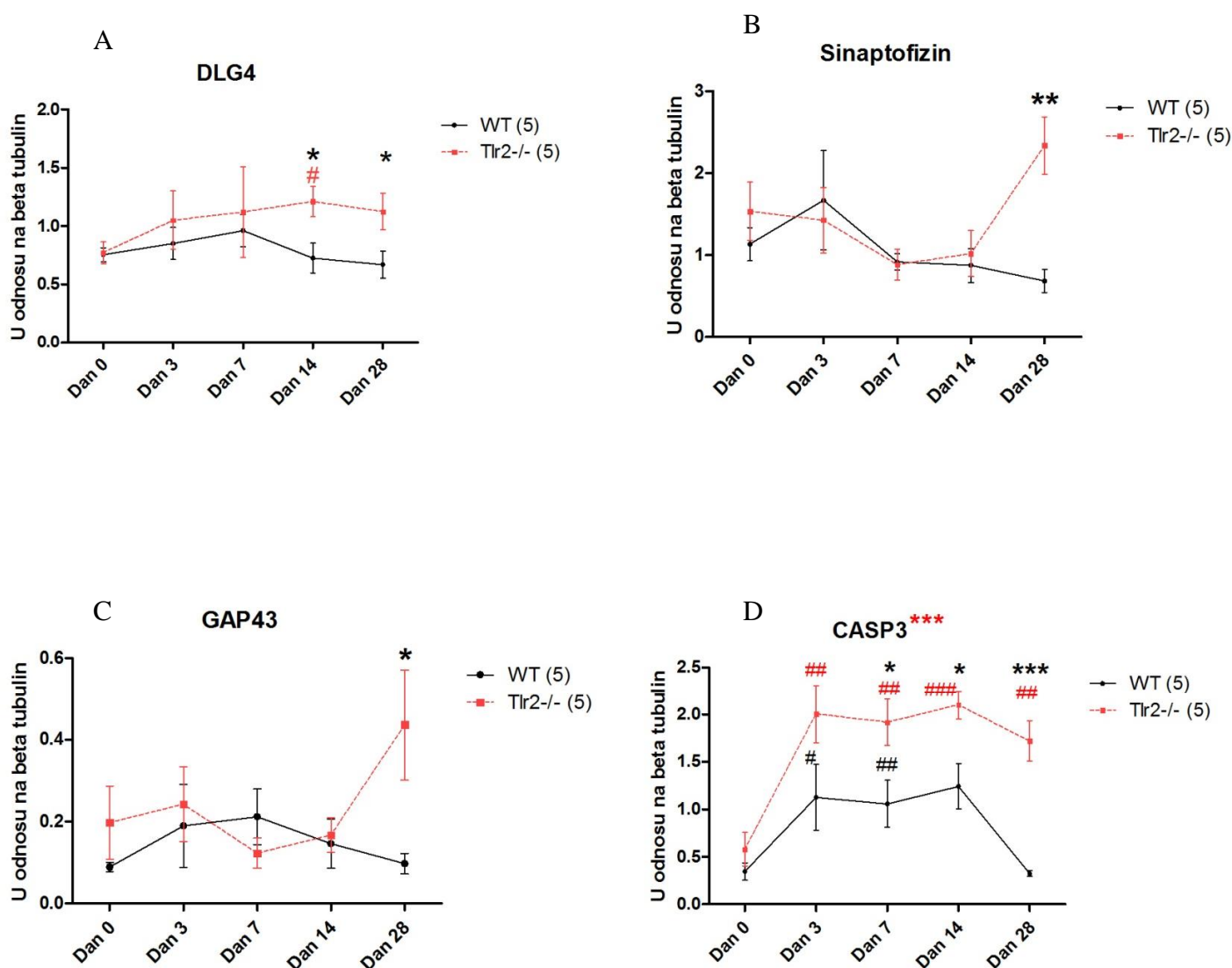
Dok je tjedan dana nakon MCAO izražaj mRNA za *Fadd* pojačan, kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa nije bilo prisutno takvo pojačanje.



**Slika 44.** Razine izražaja *Casp8* i *Fadd*. Podaci su prikazani na 2 načina: A) razine mRNA svakog gena su prikazane kao postotak u odnosu na razine izražaja endogene kontrole (*Actb*) i B) podaci svake hemisfere u određenoj vremenskoj točki su normalizirani na vrijednosti kontrole (kontrola = 1). Razlike među hemisferama su bile statistički značajne ako je  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) i  $p < 0,005$  (\*\*\*).

## 5.6. Povećana prisutnost biljega sinapsi i neuralnog stresa kod Tlr2<sup>-/-</sup> u odnosu na miševe divljeg tipa

Bjelan evine sinaptogeneze (DLG4, sinaptofizin), aksonogeneze (GAP43) i neuralnog stresa (CASP3) se razlikuju u izražaju kod WT i Tlr2<sup>-/-</sup> miševa mjereno Western blotom (Slika 46.).



**Slika 45.** Izražaj bjelančevina DGL4(A), sinaptofizina (B), GAP43 (C) i CASP3 (D) u ipsilateralnoj moždanoj kori ispitivano Western blotom u odnosu na bjelančevinu održavanja stanice beta-tubulin u vremenskoj točki 0 za početne vrijednosti te 3, 7, 14 i 28 dana nakon ishemijskog oštećenja. Crkanoo je označena skupina s onemogućenim TLR2.

### 5.6.1. Odsutstvo funkcionalnog TLR2 povećava količinu bjeljan evine DLG4 i sinaptofizina u kroničnoj fazi oporavka od ishemijskog oštećenja u odnosu na miševu divljeg tipa

Kod analize izražaja bjeljan evine DLG4 (omjer količine u odnosu na  $\beta$ -tubulin), koja predstavlja postsinaptičku sastavnicu sinapse, nisu postojale razlike u postotnim vrijednostima između genotipova, obzirom da je tada prosječna vrijednost kod WT iznosila  $0,75 \pm 0,06$ , a kod Tlr2<sup>-/-</sup> skupine  $0,77 \pm 0,09$  (Tablica 25).

Treći dan nakon MCAO dolazi do blagog porasta količine DLG4 na prosječnu vrijednost od  $0,85 \pm 0,14$  kod WT skupine, odnosno nešto intenzivnijeg porasta na  $1,05 \pm 0,25$  kod Tlr2<sup>-/-</sup>. 7. dan porast izražaja bjeljan evine DLG4 se i dalje nastavlja povećavati polagano na  $0,96 \pm 0,14$  kod divljih tipova, a kod Tlr2<sup>-/-</sup> miševa u većoj mjeri na  $1,12 \pm 0,39$ .

Dva tjedna nakon ishemijskog oštećenja kod WT skupine miševa započeo je trend opadanja količine DLG4 na  $0,73 \pm 0,13$ , dok kod skupine bez funkcionalnog TLR2 vrijednost DLG4 i dalje nastavlja blago rasti na  $1,21 \pm 0,13$  te je prosječna razlika srednjih vrijednosti  $0,4847 \pm 0,1836$ , što je s 95% intervalom pouzdanosti od 0,9 do 0,7 statistički značajno s  $P=0,0269$ .

Uspoređuje li se taj rezultat s postotnim vrijednostima kontrolne Tlr2<sup>-/-</sup> skupine ( $0,77 \pm 0,09$ ), razlika je s prosječnom razlikom srednjih vrijednosti od  $0,4388 \pm 0,16$  također statistički značajna s  $P=0,0251$  (95% IP= 0,8 do 0,07).

Srednja vrijednost količine bjeljan evine DLG4 kod WT skupine nastavila je padati u odnosu na 7. dan te je u vremenskoj točki 28. dana iznosila  $0,67$  (SEM=  $\pm 0,117$ ), dok je kod Tlr2<sup>-/-</sup> ta vrijednost također počela opadati u odnosu na maksimalnu vrijednost 14. dana, ali je i dalje sa srednjom vrijednosti  $1,125$  (SEM= $\pm 0,1548$ ) bila viša od vrijednosti divljih tipova. S razlikom srednjih vrijednosti od  $0,46 \pm 0,19$  i 95% IP od 0,9054 do 0,006, ta je razlika statistički značajna s  $P=0,0475$ .

**Tablica 25.** Količina bjeljančevine DLG4 u odnosu na  $\beta$ -tubulin sa standardnom pogreškom po vremenskim točkama nakon MCAO za miševu divljeg tipa (WT) i Tlr2<sup>-/-</sup> s P vrijednostima za t-test u odnosu na Dan 0 unutar genotipa, te po vremenskim točkama između genotipova.

DLG4 Vrijeme	WT	P za Dan 0	Tlr2 <sup>-/-</sup>	P za dan 0	P WT vs Tlr2 <sup>-/-</sup>
Dan 0	$0,7542 \pm 0,05934$		$0,7721 \pm 0,09395$		P= 0,8766
Dan 3	$0,8516 \pm 0,1364$	0,5579	$1,050 \pm 0,2509$	0,3636	P=0,5038
Dan 7	$0,9621 \pm 0,1382$	0,2312	$1,121 \pm 0,3905$	0,4103	P=0,6889
Dan 14	$0,7261 \pm 0,1284$	0,8572	$1,211 \pm 0,1290$	<b>0,0251</b>	<b>*P=0,0269</b>
Dan 28	$0,6688 \pm 0,1170$	0,5333	$1,125 \pm 0,1548$	0,0805	<b>*P= 0,0475</b>

Analiziraju i izraflaj sinaptofizina, bjelan evine koja predstavlja presinapti ku sastavnicu sinapse uo eno je da postoji po etna razlika kod netretiranih flivotinja WT ( $1,13 \pm 0,2$ ) i Tlr2-/- ( $1,54 \pm 0,35$ ) skupina, no ona nije statisti ki zna ajna (Tablica 26.). Dinamika izraflaja na razini bjelan evine kod sinaptofizina u IL hemisferi kod divljih tipova pokazuje porast u akutnoj vremenskoj to ki od 3 dana na  $1,67 \pm 0,6$ , dok kod Tlr2-/- mi-eva po inje opadati na  $1,42 \pm 0,4$ . Nakon tog po etnog porasta, koli ina sinaptofizina kod divljeg tipa trajno opada dostiflu i najmanju vrijednost mjesec dana nakon MCAO s prosje nom vrijednosti  $0,68 \pm 0,14$ . U skupini bez funkcionalnog TLR2 nastavlja se pad s minimumom u subakutnoj vremenskoj to ki od 7 dana na srednju vrijednost od  $0,88 \pm 0,19$ , nakon toga 14 dan raste blago ( $1,02 \pm 0,28$ ) a potom i dramati no na  $2,34 \pm 0,35$  gdje se od divljih tipova statisti ki zna ajno razlikuje s  $P=0,0055$  (srednja razlika  $-1,7 \pm 0,4$ , 95%IP = od  $-2,6$  do  $-0,67$ ).

**Tablica 26.** Količina bjelančevine sinaptofizina u odnosu na  $\beta$ -tubulin sa standardnom pogreškom po vremenskim točkama nakon MCAO za miševe divljeg tipa (WT) i Tlr2-/- s P vrijednostima za t-test u odnosu na Dan 0 unutar genotipa, te po vremenskim točkama između genotipova.

Sinaptofizin	WT	P za Dan 0	Tlr2-/-	P za dan 0	P WT vs Tlr2-/-
Dan 0	$1,134 \pm 0,2007$		$1,537 \pm 0,3546$		$P=0,3516$
Dan 3	$1,669 \pm 0,6061$	0,4601	$1,425 \pm 0,4011$	0,8426	$P=0,7436$
Dan 7	$0,9173 \pm 0,1009$	0,3352	$0,8829 \pm 0,1897$	0,1425	$P=0,8701$
Dan 14	$0,8760 \pm 0,2088$	0,4024	$1,019 \pm 0,2789$	0,2842	$P=0,6852$
Dan 28	$0,6847 \pm 0,1412$	0,1266	$2,339 \pm 0,3522$	0,1470	<b>**P=0,0055</b>

### 5.6.2. Povećana prisutnost bjelančevine GAP43 u kroničnoj fazi oporavka od ishemijskog oštećenja kod Tlr2-/- u odnosu na miševe divljeg tipa

Sli no je opafleno mjere i izraflaj bjelan evine GAP43, odgovorne za razvoj aksona i pokazatelj restrukturiranja neurona.

Kod divljih tipova po etna je vrijednost izmjerena Western blotom u prosjeku  $0,08 \pm 0,01$ , a kod Tlr2-/- skupine je vi-a i iznosi  $0,2 \pm 0,09$  (Tablica 27.).

**Tablica 27.** Količina bjelančevine GAP43 u odnosu na  $\beta$ -tubulin sa standardnom pogreškom po vremenskim točkama nakon MCAO za miševe divljeg tipa (WT) i Tlr2-/- s P vrijednostima za t-test u odnosu na Dan 0 unutar genotipa, te po vremenskim točkama između genotipova.

GAP43	WT	P za Dan 0	Tlr2-/-	P za dan 0	P WT vs Tlr2-/-
Dan 0	$0,08834 \pm 0,01133$		$0,1967 \pm 0,08948$		$P=0,2638$
Dan 3	$0,1890 \pm 0,1013$	0,3941	$0,2416 \pm 0,09041$	0,7335	$P=0,7132$
Dan 7	$0,2113 \pm 0,06819$	0,1405	$0,1224 \pm 0,03667$	0,4641	$P=0,3084$
Dan 14	$0,1456 \pm 0,06022$	0,4172	$0,1663 \pm 0,04225$	0,7515	$P=0,7845$
Dan 28	$0,09683 \pm 0,02550$	0,7687	$0,4360 \pm 0,1352$	0,1783	<b>*P=0,039</b>

U akutnoj vremenskoj to ki od 3 dana nakon MCAO po inje porast izraflaja GAP43 bjelan evine kod oba genotipa, no kod Tlr2-/- mi-eva taj je porast manjeg nagiba.

Subakutno, tjedan dana nakon ishemije, GAP43 dostifle svoju maksimalnu koli inu kod divljih tipova ( $0,21 \pm 0,07$ ) te u kroni nom razdoblju opada i 28. dan dostifle vrijednost tek ne-to vi-u od po etne ( $0,097 \pm 0,025$ ).

GAP43 kod Tlr2-/- pokazuje druga iju dinamiku s dva vrha od kojih je prvi blaffi 3 dana nakon MCAO ( $0,24 \pm 0,09$ ) i prati porast kod divljih tipova.

Potom u subakutnoj vremenskoj to ki koli ina GAP43 bjelan evine opada na najmanju razinu izmjerenu kod Tlr2-/- flivotinja ( $0,12 \pm 0,04$ ). U tom je trenutku kod divljih tipova koli ina GAP43 bjelan evine najvi-a.

Drugi porast koli ine biljega GAP43 kod Tlr2-/- mi-eva javlja se u kroni noj vremenskoj to ki od mjesec dana ( $0,44 \pm 0,14$ ) te predstavlja statisti ki zna ajno ve u koli inu navedene bjelan evine u odnosu na WT skupinu (razlika srednjih vrijednosti =  $-0,34 \pm 0,14$ , 95% IP=od  $-0,66$  do  $-0,022$ ,  $P=0,0390$ )

### 5.6.3. Snažnija i dugotrajnija prisutnost CASP3 nakon ishemijskog oštećenja kod Tlr2-/- u odnosu na miševe divljeg tipa

CASP3 je bjelan evina za koju se smatralo da je izraflena samo u apoptoti kim stanicama, no nedavna istraflivanja pokazuju kako posjeduje i neapoptoti ku regulatornu funkciju u neurogenezi i sinapti koj aktivnosti (175).

Po etne vrijednosti bile su neznatno vi-e kod Tlr2-/- mi-eva ( $0,58 \pm 0,18$ ) u odnosu na WT ( $0,34 \pm 0,09$ ) (Tablica 28.).

**Tablica 28.** Količina bjelančevine CASP3 u odnosu na  $\beta$ -tubulin sa standardnom pogreškom po vremenskim točkama nakon MCAO za miševe divljeg tipa (WT) i Tlr2-/- s P vrijednostima za t-test u odnosu na Dan 0 unutar genotipa, te po vremenskim točkama između genotipova.

CASP3	WT	P za Dan 0	Tlr2-/-	P za dan 0	P WT vs Tlr2-/-
Dan 0	$0,3438 \pm 0,08980$		$0,5788 \pm 0,1778$		0,2719
Dan 3	$1,126 \pm 0,3483$	0,0614	$2,004 \pm 0,3053$	<b>0,0038</b>	0,0944
Dan 7	$1,058 \pm 0,2474$	<b>0,0265</b>	$1,915 \pm 0,2458$	<b>0,0023</b>	<b>*P=0,0396</b>
Dan 14	$1,241 \pm 0,2379$	<b>0,0077</b>	$2,100 \pm 0,1486$	<b>0,0002</b>	<b>*P=0,0155</b>
Dan 28	$0,3217 \pm 0,02941$	0,8212	$1,717 \pm 0,2105$	<b>0,0033</b>	<b>***P=0,0002</b>



U akutnoj vremenskoj točki od 3 dana količina bjelane bjelane evine kod uzoraka WT skupine naglo raste te se gotovo udvostručava ( $1,13 \pm 0,35$ ) i na toj razini perzistira i 7. ( $1,06 \pm 0,25$ ) i 14. dana ( $1,24 \pm 0,24$ ) kad se statistički značajno razlikuje od svoje početne vrijednosti mjereno t-testom (0,0265; 0,0077). Mjesec dana nakon MCAO razina CASP bjelane evine kod WT miševa se vraća na početne vrijednosti ( $0,322 \pm 0,03$ ).

Tlr2<sup>-/-</sup> miševi intenzivnije reagiraju na ishemijsku leziju četverostruko povećavaju i količinu CASP3 u akutnoj vremenskoj točki 3. dana ( $2,0 \pm 0,3$ ). Pri tom se statistički značajno razlikuje od svojih početnih vrijednosti ( $P=0,0038$ ). Potom dinamika izražaja CASP3 bjelane evine prati dinamiku detektiranu kod divljih tipova tako da ostaje povišena i 7. i 14. dan nakon ishemijske lezije. Pri tome je razina CASP3 statistički značajno povišena kod Tlr2<sup>-/-</sup> u usporedbi s miševima WT skupine ( $P=0,0396$ ), ali ponovno i vrijednosti vlastitih lažno operiranih kontrola ( $P=0,0023$ ).

Dva tjedna nakon MCAO količina CASP3 kod Tlr2<sup>-/-</sup> se ponovno blago povećava na  $2,1 \pm 0,15$  te u odnosu na početne vrijednosti kontrola postaje statistički još značajnije viša ( $P=0,0002$ ).

U kroničnoj fazi oporavka dolazi do rezolucije i kod Tlr2<sup>-/-</sup> miševa u pogledu količine CASP3, no ona opada blaže nego li kod miševa koji imaju funkcionalan TLR2. Dok se kod WT skupine vrijednosti CASP3 detektirane Western blotom vraćaju na početne, kod miševa bez funkcionalnog TLR2 razina se spušta na vrijednost koja je i dalje trostruko veća od kontrola te se statistički izrazito značajno razlikuje i od početnih vrijednosti za vlastiti genotip ( $P=0,0033$ ), ali i u usporedbi s WT skupinom izloženom MCAO ( $P=0,002$ ).

Takav rezultat pokazuje snažniji izražaj CASP3 na razini bjelane evine u mirovanju, ali osobito nakon MCAO kod Tlr2<sup>-/-</sup> miševa u odnosu na WT koji sadrže TLR2, što dovodi do zaključka kako putevi neovisni o TLR2 koji su u njegovom odsustvu pojačani, ranije dovode do pojačanog uključivanja proapoptotičkih kaskadnih imbenika te takvi signalni putevi perzistiraju duže nego li u prisutstvu funkcionalnog TLR2.

## 5.7. GAP43 i CASP3 su biljezi neuralnog stresa

Obzirom da je kod Tlr2<sup>-/-</sup> miševa uočena deregulacija signalnog puta TLR2 i oštećenje funkcije urođene imunosti posredovane TLR2, rezultati dosadašnjih funkcionalnih i molekularnih usporedbi Tlr2<sup>-/-</sup> skupina s miševima koji imaju djelatni TLR2 ukazuju na značajne parametre s potencijalom da se koriste kao biljezi za aktivnost upale i regeneracije, odnosno detekciju imunološki posredovanog neuralnog stresa koji predstavlja opasnost za daljnje pogoršanje ili oporavak. Ti bi biljezi u budućnosti omogućili standardizirano praćenje tolerancije na ishemijsko oštećenje uslijed reprogramiranja bilo kojeg dijela imunološkog odgovora koji se izvršava putem TLR2.

Kako bi neki od navedenih pokazatelja predstavljali dobre kandidate za biomarkere, potrebno je da su snažno pojačani ili, s druge strane, snažno utišani tijekom oporavka od ishemijskog oštećenja, te da postoji jednostavan i neinvazivni način njihovog praćenja.

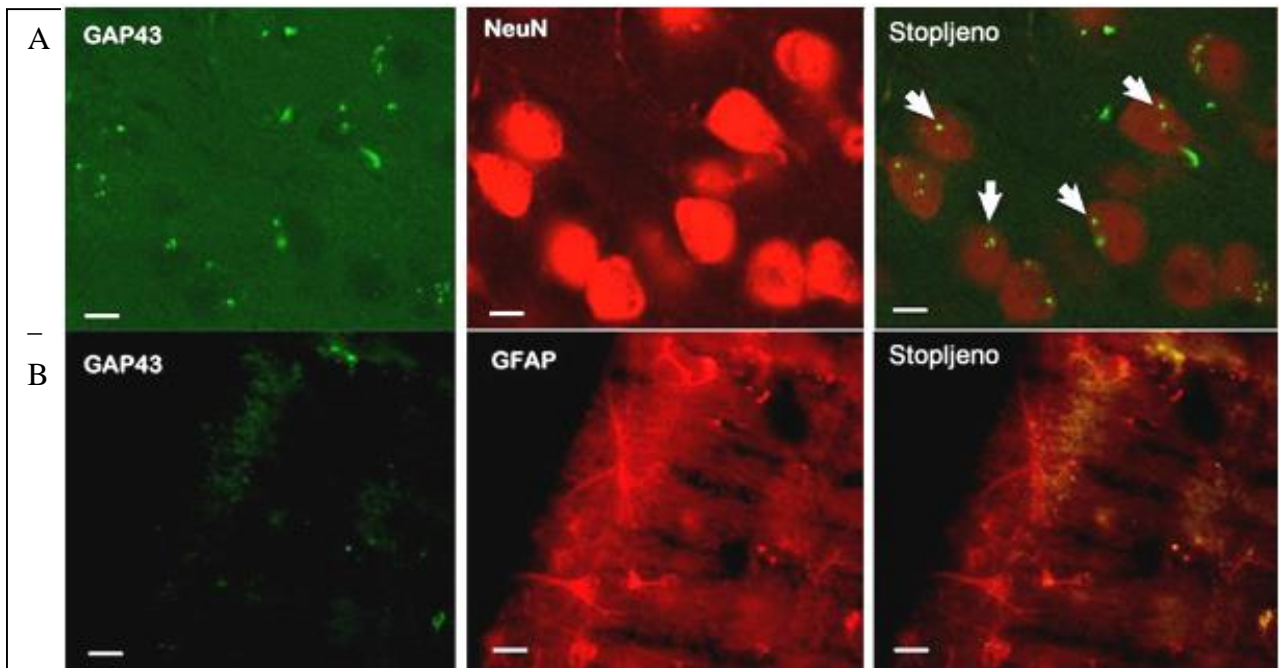
Od imbenika koji pokazuju oporavak neuralne mreže, kao značajni bjelaničevina identificiran je GAP43 koji radi svojeg izražaja tijekom razvoja aksona integrira neurogenezu i sinaptičku plastičnost na razini arborizacije novopotaknutih stanica.

Kako je najintenzivniji odgovor na razini bjelaničevina u usporedbi Tlr2<sup>-/-</sup> i WT miševa na njih promatraju i dinamiku izražaja CASP3 nakon ishemijskog oštećenja, kao drugi biljeg odabran je biljeg CASP3 koji svojom dominantnom proapoptotičkom funkcijom predstavlja destruktivni krak na postishemijskoj prevagi.

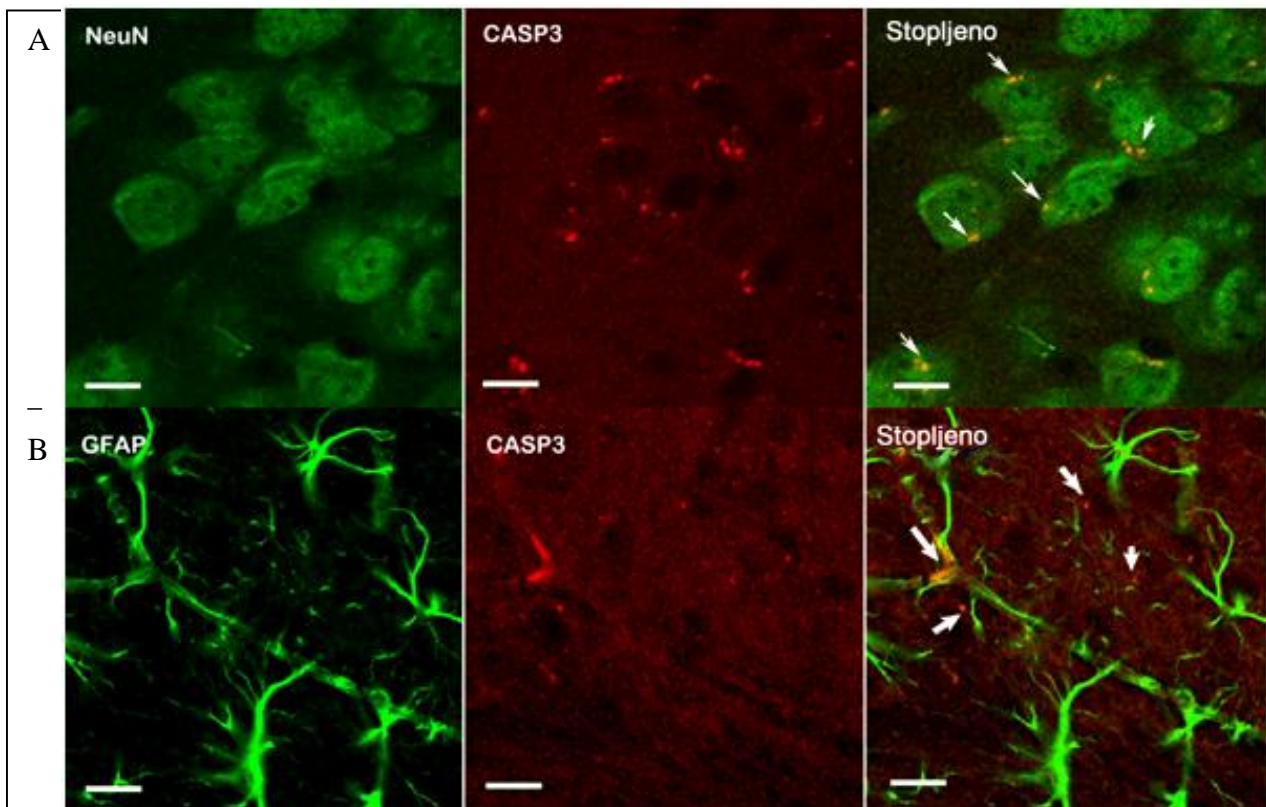
Stoga se pristupilo analizi njihove unutarstanične zastupljenosti prije i nakon ishemijskog oštećenja i nalaganju metodološkog pristupa za njihovu *in vivo* detekciju.

### 5.7.1. GAP43 i CASP3 su primarno prisutni u neuronima nakon ishemijskog oštećenja

Kako bi se odredilo koje su stanice sadržavale GAP43 i CASP3, proveda se dvostruka imunohistokemija za biljege astrocita i neurona na tkivu mišjeg mozga zahvaćenom ishemijskom. Dvostruka imunohistokemija s GAP43 i NeuN protutijelima otkrila je da je GAP43 prisutan isključivo u neuronima (Slika 46., A.). Na temelju bojenja s GAP43 i GFAP (glijalna fibrilarna kisela bjelaničevina, biljeg astrocita) nije uočena prisutnost GAP43 u astrocitima (Slika 46., B.). Biljeg CASP3 nađen je također primarno u neuronima, dok je istovremeno bio prisutan i u astrocitima, no u manjoj mjeri (Slika 47., A i B).



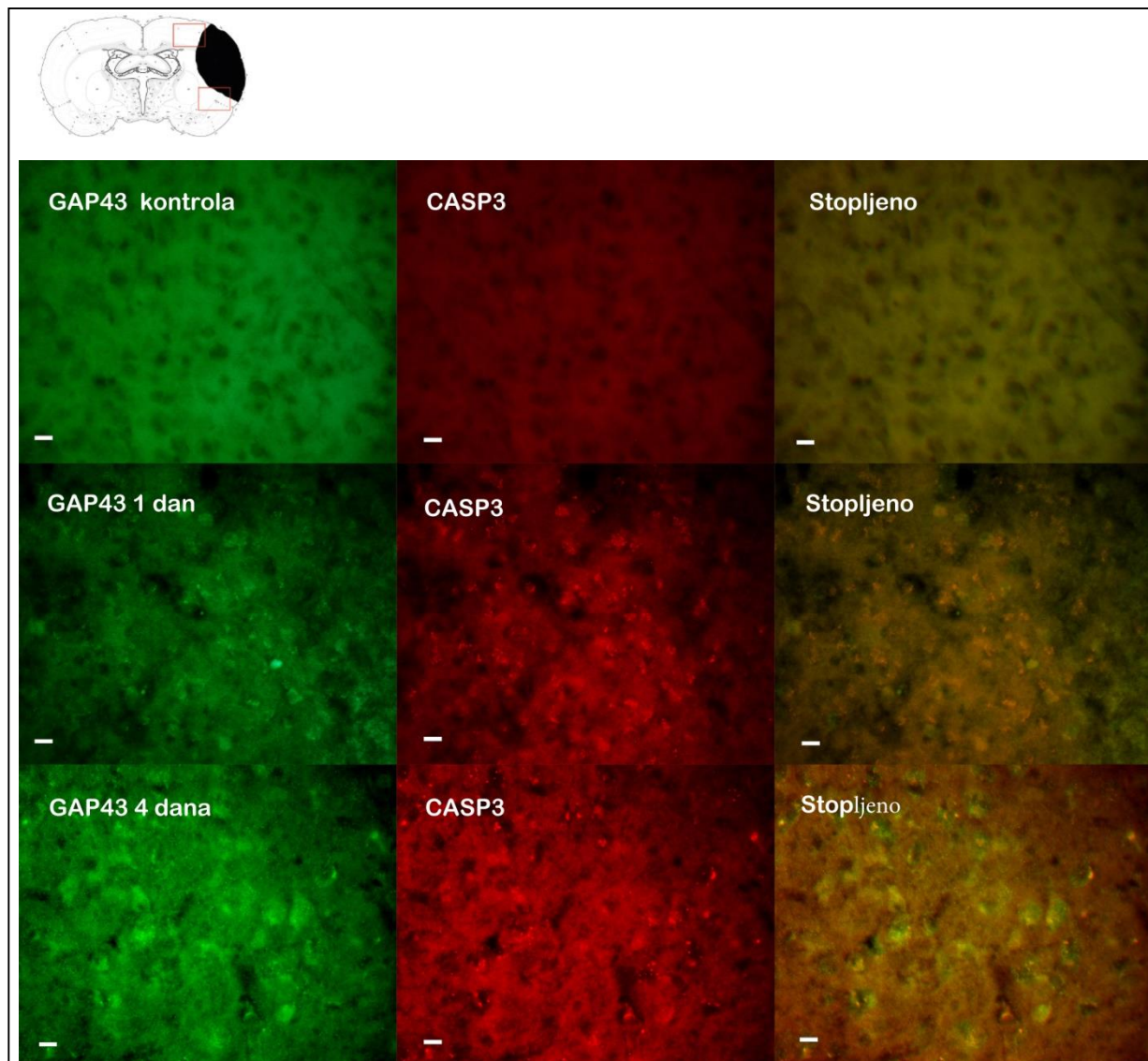
**Slika 46.** A) Imunohistokemija u kori mišjeg mozga oko oštećenja prikazuje signal GFP-a čiji je izražaj potaknut promotorom Gap43 gena (zeleno) pokazuje kolokalizaciju s biljgom neurona, NeuN-om (crveno). B) Imunohistokemija u perilezionalnoj kori mišjeg mozga prikazuje signal GFP-a (zeleno) i signal GFAP-a biljega astrocita (crveno), bez kolokalizacije u ishemijskoj penumbri. Crveni pravokutnici na shematskom prikazu označavaju perilezionalni korteks koji je uz homotopni kontralateralni korteks predstavljao područje analize. Mjerilo 20  $\mu$ m.



**Slika 47.** Imunohistokemija u perilezionalnoj kori mišjeg mozga prikazuje signal CASP3 (crveno) koji je primarno prisutan u stanicama koje su pozitivne na NeuN (A, zeleno), no istovremeno i u GFAP pozitivnim astrocitima (B, zeleno) u manjoj mjeri 4 dana nakon MCAO. Strelice ukazuju na područja gdje je jasno uočljiv signal dvostruko pozitivne imunohistokemije. Crveni pravokutnici na shematskom prikazu označavaju perilezionalni korteks koji je uz homotopni kontralateralni korteks predstavljao područje analize. Mjerilo 10  $\mu$ m.

### 5.7.2. Izražaj *Gap43* i *Casp3* se značajno povećao nakon ishemijske lezije

Imunohistokemija je pokazala da već jedan dan nakon MCAO, te još naglašenije 4 dana nakon ishemijskog oštećenja, izražava GAP43 i CASP3 značajno rastu (t-test  $P < 0,0001$ ) (Slika 48.).



**Slika 48.** Imunohistokemija signala GFP-a (zeleno) potaknuta promotorom gena *Gap43* i biljega *CASP3* (crveno) kod lažno operiranih *GAP43-luc/gfp* kontrola te 1 i 4 dana nakon ishemijskog oštećenja u ipsilateralnoj kori. Jasno je vidljivo povećanje intenziteta signala za *GAP43* i *CASP3*. Crveni pravokutnici na shematskom prikazu označavaju perilezionalni korteks koji je uz homotopni kontralateralni korteks predstavljao područje analize. Mjerilo  $20\mu\text{m}$ .

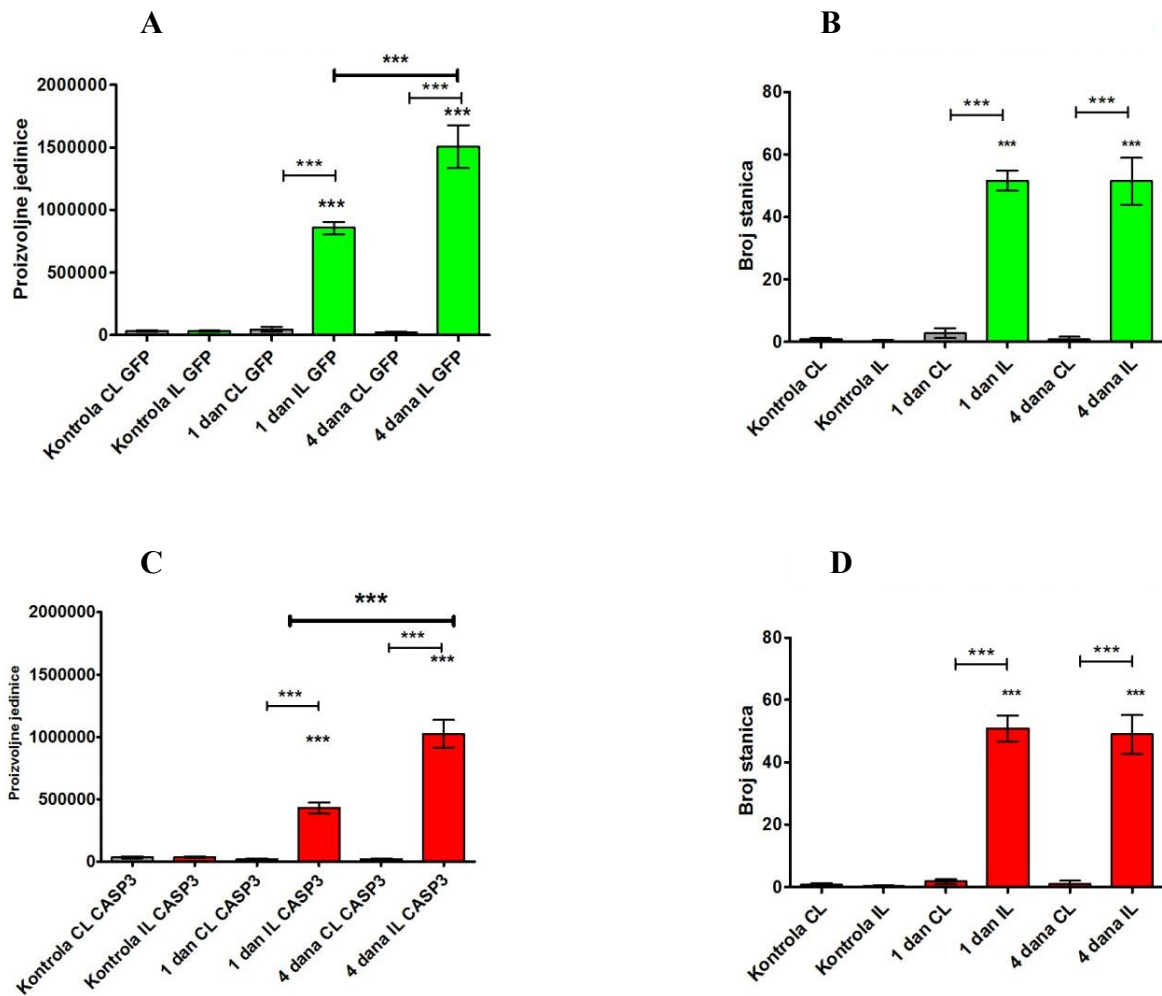
Metoda integrirane optičke gustoće pokazala je da se izražava biljega *GAP43* povećao 27 puta 1. dan nakon ishemijske lezije, dok je 4 dana nakon MCAO povećanje iznosilo 47 puta, što je u skladu s rezultatima kvantifikacije metodom Western blota.



Broj stanica pozitivnih na GAP43 poveao se 206 puta, a 4 dana nakon ishemiije 205 puta u odnosu na kontrolu (Slika 49.), –to nije detektirano Western blotom.

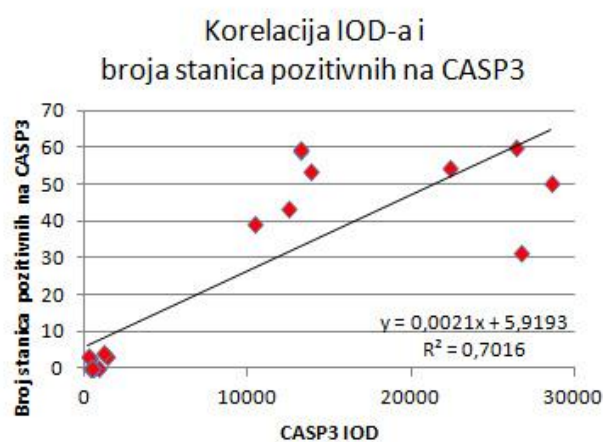
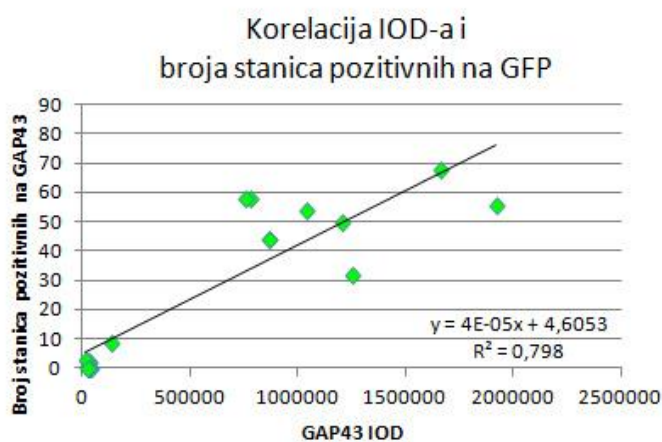
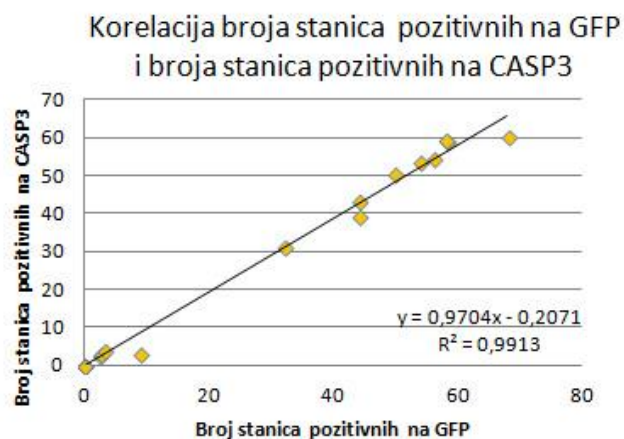
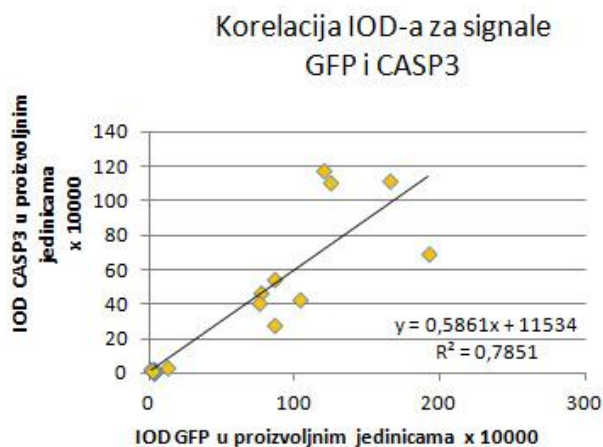
Integrirana optika gustoća za biljega CASP3 prvi se dan poveala 24 puta, a 4. dan nakon ishemijskog oštećenja čak 42 puta u odnosu na kontrolu.

Broj CASP3 pozitivnih stanica poveao se u odnosu na lažno operirane flivotinje 203 i 204 puta prvi i četvrti dan nakon MCAO, navedenim redom (Slika 50.).



**Slika 49.** Prikazi IOD-a i broja stanica za GFP(A) i CASP3 (C) u ipsilateralnoj (IL) i kontralateralnoj hemisferi (CL) mišjeg mozga 1 i 4 dana nakon MCAO u odnosu na lažno operiranu kontrolu dobiveni snimanjem fluorescencije imunohistokemije na fluorescentnom mikroskopu te analizom IOD-a za GFP (B) i CASP3 (D) pomoću ImageJ programa.

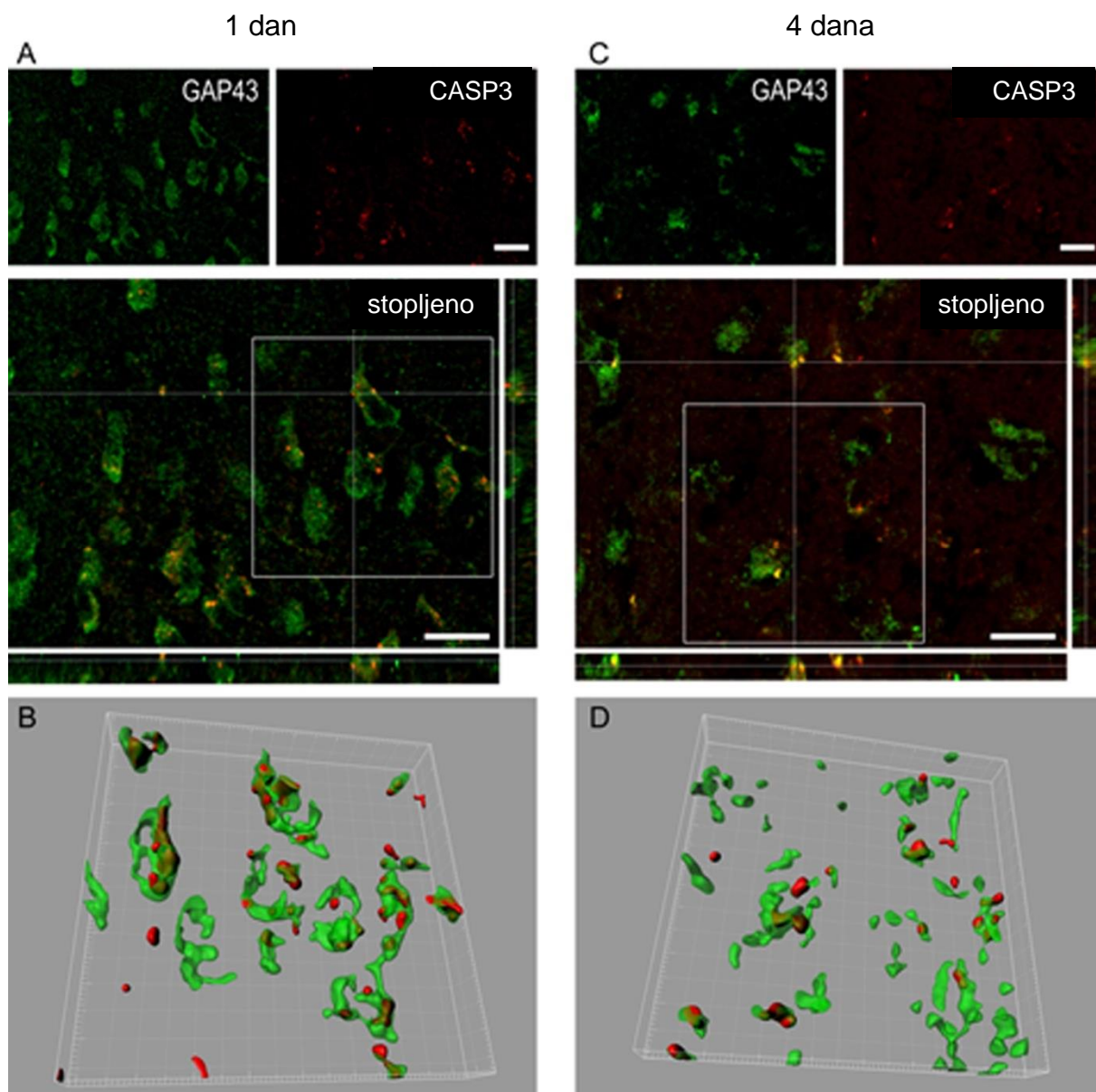
Povećanje signala biljega GAP43 nakon MCAO je koreliralo s intenzitetom signala biljega CASP3 mjereno integriranom optikom gustoćom ( $R^2 = 0.79$ , Slika 51., A). Još je snažnija korelacija broja stanica pozitivnih na GAP43 i CASP3 ( $R^2 = 0.99$ , Slika 51., B).



**Slika 50.** **A)** Korelacija IOD-a GFP (apscisa) s IOD CASP3 (ordinata) 0, 1 i 4 dana nakon MCAO. **B)** Korelacija broja stanica pozitivnih na GFP (apscisa) i broja stanica pozitivnih na CASP3 (ordinata) 0, 1 i 4 dana nakon MCAO. **C)** Odnos linearne korelacije IOD-a za GFP (apscisa) i broja stanica koje sadrže biljeg GFP (ordinata) u pojedinačnim vidnim poljima 0, 1 i 4 dana nakon moždanog udara. **D)** Odnos linearne korelacije IOD-a za CASP3 (apscisa) i broja stanica koje sadrže biljeg CASP3 (ordinata) u pojedinačnim vidnim poljima 0, 1 i 4 dana nakon moždanog udara.

Stavljaju i IOD signala za GFP i broj stanica pozitivnih na GFP u odnos linearne korelacije dobila se snažnija korelacija ( $R^2 = 0,80$ ) nego li uspore uju i IOD signala za CASP3 i broj stanica pozitivnih na CASP ( $R^2 = 0,70$ ) –to govori u prilog razli itoj koli ini izraflaja CASP3 po stanici, dok je GFP uglavnom konstantno izraflen u pojedinoj stanici (Slika 51, C i D).

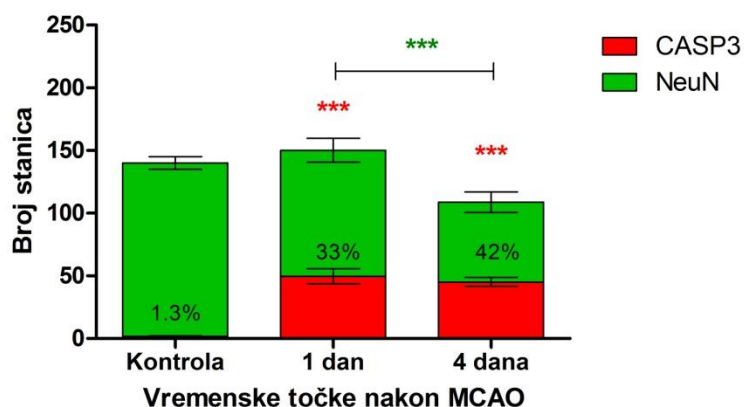
Kolokalizacija signala potvr ena je i uporabom konfokalnog mikroskopa te 3D rekonstrukcijom koriste i program Imaris® (Slika 51).



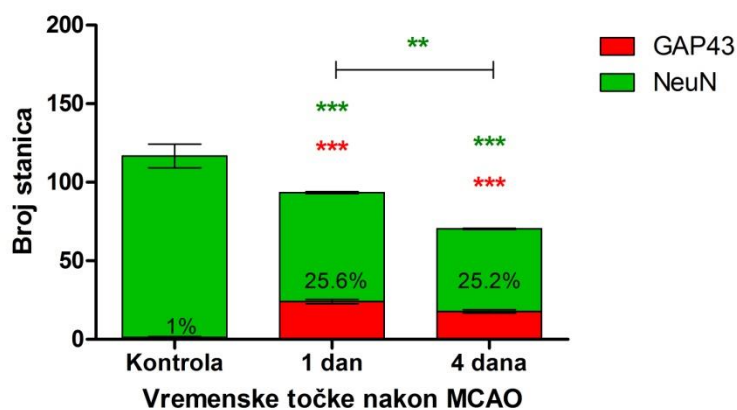
**Slika 51.** Prikaz signala GFP-a potaknutog promotorom gena za Gap43 (zeleno, GAP43) i CASP3 (crveno, CASP3) na konfokalnom mikroskopu. Stapanje slika crvenog i zelenog kanala (stopljeno u A i C) te 3D rekonstrukcija uz pomoć programa Imaris® 1. (B) i 4. dan (D) nakon ishemije.

Broje i postotni udio neurona koji su pozitivni za CASP3, njihov se broj poveća s početnih manje od 1% kod zdravih mišinskih kora na 33% i 42% neurona pozitivnih na CASP3 u periinfarktnoj kori 1. i 4. dana nakon MCAO, navedenim redom (Slika 52.). U istoj regiji postotak neurona pozitivnih za GAP43 bio je 1% kod kontrola, te se poveća na 26% i 25% 1. i 4. dan nakon MCAO, navedenim redom (Slika 53.).

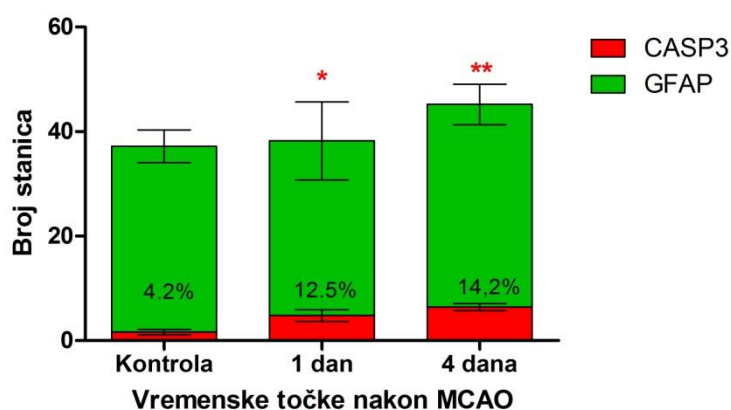
Biljag astrocita, GFAP je kolokalizirao s CASP3 u 4% stanica u zdravom mozgu te u 13% i 14% stanica 1. i 4. dan nakon MCAO, navedenim redom (Slika 54.). Kao što je ranije navedeno, u astrocitima nije nađen izražaj GAP43, ni prije, ni nakon ishemijske lezije.



**Slika 52.** Udjeli CASP3 (crveno) pozitivnih neurona identificiranih pomoću anti-NeuN i anti-CASP3 protutijela 1 i 4 dana nakon ishemije u odnosu na kontrolu.



**Slika 53.** Udjeli GFP (crveno) pozitivnih neurona koji odražavaju izražaj bjelančevine GAP43 identificiranih pomoću anti-NeuN i anti-GFP protutijela 1 i 4 dana nakon ishemije u odnosu na kontrolu.



**Slika 54.** Udjeli CASP3 (crveno) pozitivnih astrocita identificiranih pomoću anti-GFAP i anti-CASP3 protutijela 1 i 4 dana nakon ishemije u odnosu na kontrolu.



### 5.7.3. *In vivo* praćenje postishemijskog izražaja gena *Gap43* na modelu transgeničnih *Gap43-luc/gfp* miševa

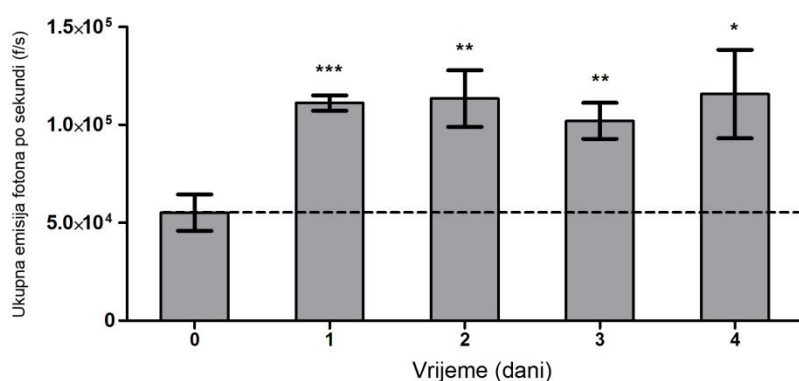
Kako bi se potvrdio ranije uspostavljeni protokol za praćenje izražaja gena *Gap43*, korišten je bioluminiscentni segment reporterskog sustava, luciferaza, čija se prisutnost na razini gena potvrđuje genotipizacijom PCR-om (127).

Optimalno vrijeme za snimanje signala bioluminiscencije je određeno na 20 minuta nakon intraperitonealne injekcije D-luciferina (Promega, Wisconsin USA) u dozi od 0,15 mg/kg. Intenzitet bioluminiscencije potom nastavlja opadati i u potpunosti isezava 2 sata nakon primjene tog supstrata, nakon čega je moguće primijeniti drugi protokol bioluminiscencije bez preklapanja signala (176).

Početne vrijednosti su snimljene za 4 miševa ( $55210 \pm 9297$  f/s), koji su potom podvrgnuti MCAO i redovito su svakodnevno praćeni kroz 4 dana (Slika 55.).

Već se 24 sata nakon ishemijskog oštećenja signal udvostručio te je bio statistički značajan u odnosu na početne vrijednosti ( $111200 \pm 3921$  f/s,  $P < 0,0001$ ).

48 sati nakon MCAO signal bioluminiscencije potaknute izražajem *Gap43* je nastavio blago rasti ( $113500 \pm 14470$  f/s,  $P = 0,0035$ ) te se na toj razini održavao i 3. dan ( $102000 \pm 9216$  f/s,  $P = 0,0046$ ) pa sve do kraja protokola snimanja 4. dana ( $115800 \pm 22580$ ,  $P = 0,0119$ ).



**Slika 55.** Dinamika signala bioluminiscencije kod *Gap43/luc/GFP* miševa ( $N=4$ ) kroz 4 dana nakon moždanog udara. Statistički značajne razlike označene su u odnosu na početne vrijednosti (vremenska točka „0“, isprekidana horizontalna linija).

Takvi su rezultati bili u skladu s ranije objavljenim istraživanjem te su omogućili daljnji razvoj strategije bioluminiscentnog pokusa uporabom novih supstrata u kojima je dostupnost

luciferina uvjetovana prethodnim unutarstani nim reakcijama cijepanja od dodatnog spoja ili reakcijama sinteze od vi-e manjih molekula(128).

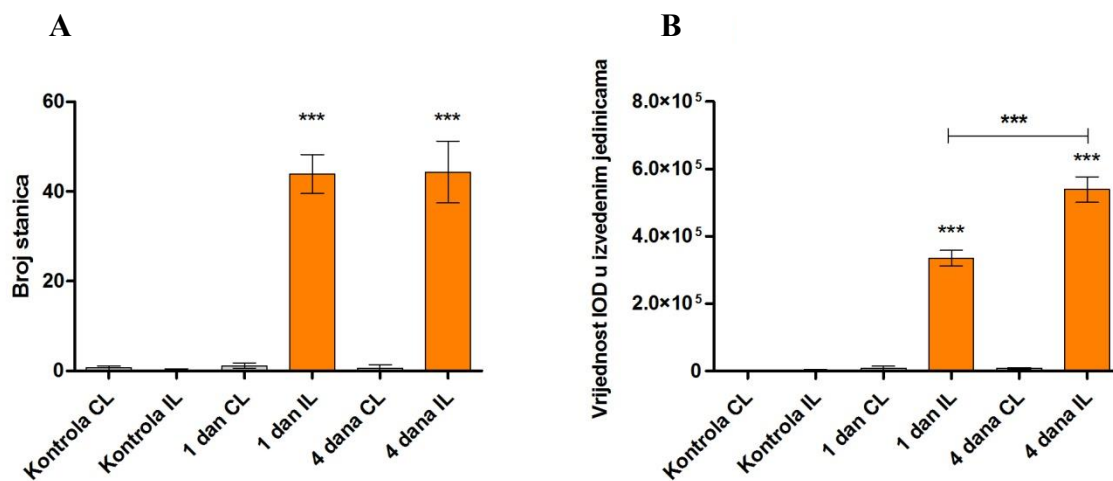
#### **5.7.4. GAP43 i CASP3 su značajno kolokalizirani nakon ishemijskog oštećenja**

Kvantifikacija broja stanica koje su istovremeno pozitivne na CASP3 i GAP43 pokazala je da njihov broj statistički značajno veći u odnosu na kontrole, obzirom da su u zdravom mozgu rijetko uočene (1-2 po vidnom polju) (Slika 56).

Već prvog dana nakon ishemije njihov je broj porastao na  $43,9 \pm 4,4$  i 4. dana ostaje na toj razini  $44,3 \pm 6,9$ . Obzirom da je tijekom mikroskopiranja primijećeno kako je signal za CASP3 neravnomjerno raspoređen u svim stanicama u kojima je prisutan (za razliku od GFP-a koji uniformno boji cijeli neuron), bilo je potrebno provjeriti intenzitet izražaja CASP3 mjerenjem integrirane optičke gustoće.

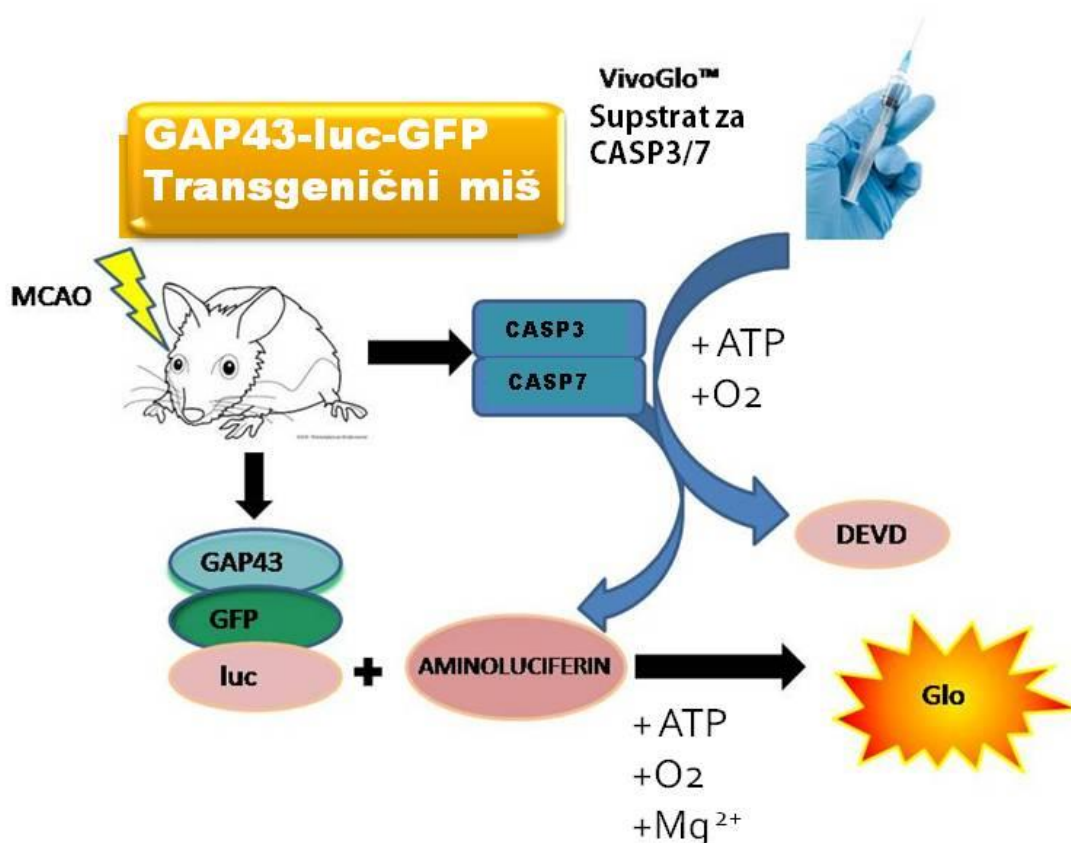
Mjerenje IOD-a pokazalo je povećanje signala koji se preklapa (CASP3 + GAP43) u odnosu na početne vrijednosti (ispilateralno  $3.100, \pm 1200$ , kontralateralno  $3.500 \pm 1.200$ ) već 24 sata nakon ishemijskog oštećenja ( $336.000 \pm 22.000$ ). Signal se prvog dana povećao i u kontralateralnoj hemisferi, ali na samo  $9.200 \pm 5.800$ . Nakon prvog povećanja od 1000 puta, signal se 4. dana još jednom udvostručio ( $540.000 \pm 38.000$ ).

Stoga iako između 1. i 4. dana nije došlo do povećanog broja stanica koje pokazuju kolokalizaciju GAP43 i CASP3, može se zaključiti kako 4. dan dolazi do unutarstani nog povećanja signala u stanicama koje su aktivirane u akutnoj fazi.



**Slika 56.** Prikazi IOD-a (A) i broja stanica (B) za kolokalizirani signal GFP i CASP3 u ipsilateralnoj (IL) i kontralateralnoj hemisferi (CL) mišjeg mozga 1 i 4 dana nakon MCAO u odnosu na kontrolu dobiveni snimanjem fluorescencije imunohistokemije na fluorescentnom mikroskopu te analizom IOD-a ImageJ programom.

Uzimaju i u obzir da je aktivna CASP3 cistein-aspartat proteaza, to je njeno svojstvo iskoristivo u vidu cijepanja malih biomolekula koje potom postaju biološki aktivne. Razvijen je trifi-lno dostupan supstrat natrijeva sol Z-DEVD-aminoluciferina (VivoGlo<sup>®</sup> Caspase-3/7 Substrate, Promega, Wisconsin, USA), koji nakon cijepanja s aktiviranom CASP3/7 osloba a samostalan pentamer DEVD (D-Cist-Z-Asp-Glu-Val-Asp) i aminoluciferin. Na taj je na in mogu e pratiti izraflaj CASP3/7 u svim viabilnim stanicama koje istovremeno izraflavaju luciferin (Slika 57). Dok je CASP7 snafno zastupljena tijekom upale u stanicama mikroglije, CASP3 je dominantiji efektor kaskade kaspaza u neuronima te se signal dobiven na taj na in u kulturama stanica ili *in vivo* mođe ve inom pripisati CASP3 (177, 178).

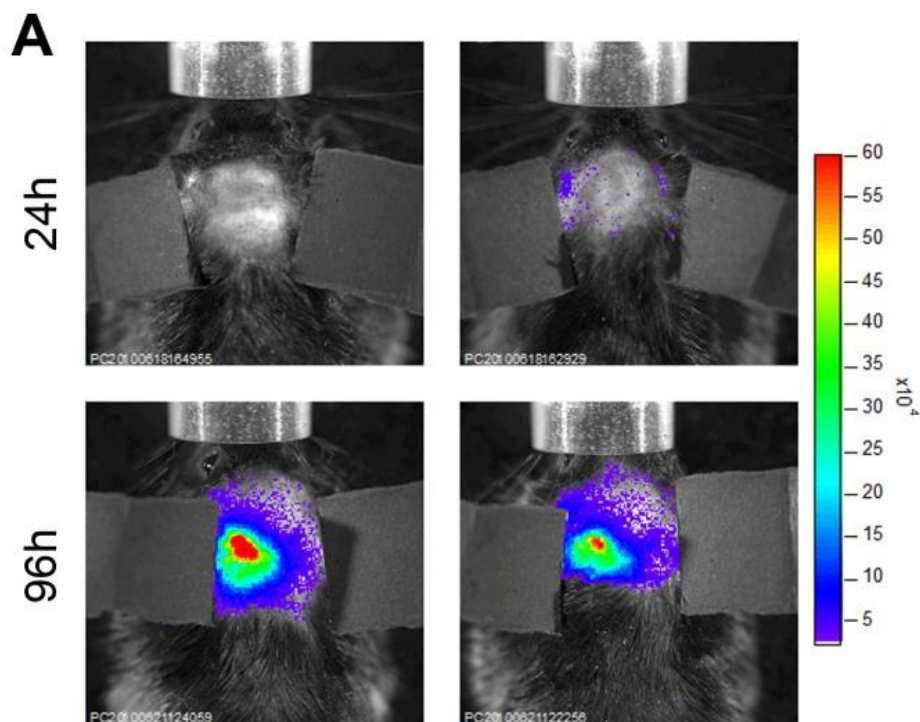


**Slika 57.** Shematski prikaz strategije pokusa sa VivoGlo™ supstratom. Nakon intraperitonealne injekcije dolazi do apsorpcije otopine cirkulaciju i njezine distribucije u mozak obzirom da prolazi krvno moždanu barijeru. Nakon ishemijskog oštećenja opsežna aktivacija CASP3 iz prokaspaze cijepa DEVD pentamer sa suptrata oslobađajući aminoluciferin. Aminoluciferin je potom dostupan za klasičnu reakciju posredovanu luciferazom krijesnice potaknutu Gap43 promotorom koga Gap43-luc/gfp miševi počinju izražavati. Signal je stoga specifičan za neurone podvrgnute staničnom stresu.

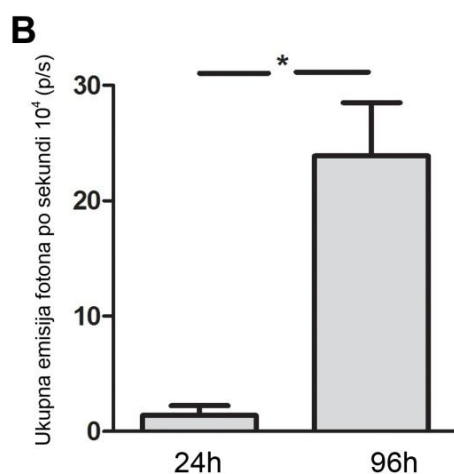
Koriste i 4 mi-a iz prethodnog pokusa u kojima se klasi nim D-luciferinom pokazalo da izraflavaju luciferazu potaknutu Gap43 promotorom, pristupilo se primjeni Z-DEVD aminoluciferina nakon –to je i– ezao prethodno postignuti signal (2 sata nakon snimanja).

Na temelju rezultata pokusa imunohistokemije odabrane su 2 vremenske to ke od 1 i 4 dana nakon ishemijske lezije, obzirom da je po etna vrijednost kolokalizacije CASP3 i GFP dobivena na rezovima tkiva pokazala zna ajnu kolokalizaciju tek 24 sata nakon MCAO, a u netretiranom tkivu takve su stanice bile rijetke. Obzirom na rasap fotona prilikom prolaska kroz tkivo, signal bioluminiscencije bio bi nezamjetan, a flivotinje bi bile izloflene nepotrebnom stresu.

Analiza bioluminiscencije primjenom supstrata VivoGlo<sup>®</sup> Caspase 3/7 pokazala je signal kolokalizacije koji se mogao kvantificirati ( $13.750 \pm 8.640$ ) ve 1 dan nakon MCAO, a potom i statisti ki zna ajni porast intenziteta signala od gotovo 20 puta 4 dana nakon MCAO ( $239.000 \pm 46.000$ ,  $P=0,0406$ ) (Slika 58.).



**Slika 58.** Reprezentativni prikaz signala bioluminiscencije koregistriranih s crno-bijelim orijentacijskim fotografijama Gap43-luc/gfp transgeničnih miševa u vidnom polju CCD kamere, 24h i 96h nakon MCAO.



**Slika 59.** Analiza detektabilnog signala kolokalizacije GAP43/CASP3 dobivenog primjenom Vivo-Glo<sup>™</sup> Caspase 3/7 supstrata za bioluminiscenciju kod transgeničnih miševa 24 sata nakon ishemijskog oštećenja, te značajan porast intenziteta signala 4 dana (96h) nakon MCAO.

## 6. RASPRAVA

### 6.1. MCAO je prvi model izbora za istraživanje molekularnih zbivanja ishemijskog oštećenja mišjeg mozga

Postupak prolazne okluzije središnje moždane arterije (MCAO) intraluminalnim filamentom je prema literaturi najčešći i model izazivanja ishemijskog oštećenja obzirom na svoju malu invazivnost (nije potrebna kraniotomija) i visoku reproducibilnost.

No, unatoč svim naporima za standardizaciju ishemijskog oštećenja, mjere i njegov volumen postoji relativno visoka standardna devijacija koja je prihvaćena prilikom standardizacije modela od 40% veličine samog oštećenja. Osim toga, nisu sve moždane strukture jednako zahvaćene kod svih miševa, te je potrebno potvrditi regionalnu raspodjelu ishemije nekom od metoda *in vivo* oslikavanja dobre prostorne razlučivosti, koje su često nedostupne za male glodavce.

Usprkos nabrojenim nedostacima, MCAO još uvijek prednjači i pred svojim alternativama ukoliko je polje interesa molekularna analiza perilezionalnog korteksa unilateralnog flaričnog oštećenja.

Podaci dobiveni LDF-om izrazito su korisni u postizanju uinka tijekom samog zahvata, te smanjuju broj potrebnih flivotinja u odnosu na zahvat bez nadzora krvnog protoka kroz teritorij MCA kad se uspješnost izazivanja lezije temeljila samo na procjeni neurološkog statusa i naknadnom nalazu tijekom izolacije mozga.

Prilikom izolacije tkiva za Western blot u akutnim vremenskim točkama bojanje TTC-om može poslužiti kao orijentacija za prisutnost lezije, ali ne i za njenu kvantifikaciju. U kasnijim vremenskim točkama TTC nije koristan orijentir, već tome služi prisutstvo ofiljka ili morfološkog defekta zahvaćene hemisfere.

Bojanje krezil violetom je iznimno koristan i jednostavan postupak koji se može provesti za sve uzorke namijenjene histološkim bojanjima, te osim utvrđivanja same prisutnosti oštećenja, omogućuje i njegovu kvantifikaciju.

Obzirom na veliku učestalost hidrocefalusa kod korićenog soja, proširenje studije MR oslikavanjem *in vivo* dalo bi presudan doprinos utvrđivanju početnog stanja za flivotinje u ispitivanju te omogućilo isključivanje onih s hidrocefalusom te identifikaciju onih s povećanjem likvorskih prostora nakon postupka MCAO.

Navedenim modelom, nakon uvodnog razdoblja uvježbavanja, postigle se zadovoljavajuće preživljenja s iznimnom smrtnošću unutar 24 sata od zahvata, osobito ukoliko se radi o modelu s reperfuzijom koji je korišten u izradi ovog doktorata.

## **6.2. Odgođeni nastup senzo-motornih simptoma neurološkog oštećenja kod Tlr2<sup>-/-</sup> miševa u odnosu na miševe divljeg tipa**

Testovi ponajprije predstavljaju najizraženiju mjeru utjecaja neurološkog oštećenja na osjet i motorne funkcije, kao i oporavka navedenih funkcija u razdoblju nakon MCAO kod miševa. Međunarodni konzorcij za ispitivanje fenotipova miševa dosad nije utvrdio osobitosti Tlr2<sup>-/-</sup> u odnosu na C57Bl/6, no razvidno je iz ranijih istraživanja (179), a i ovog provedenog u sklopu doktorata, kako postoje molekularne osnove za razlike u fiziološkim zbivanjima kod Tlr2<sup>-/-</sup> i miševa divljeg tipa osobito na temelju rezultata različitih izražaja gena uključujući i signalni put TLR2 (116).

činjenica da se ne radi o uvjetovanom isključenju gena (*engl. conditional knock out*) kojim bi se pojedini gen proizvoljno isključio nakon što je njegova dotadnja funkcija bila normalna i tijekom razvoja i tijekom odrasle dobi, ostavlja mogućnost utjecaja trajnog isključenja Tlr2<sup>-/-</sup> gena na početno stanje miševa koji ga ne posjeduju, ali i na njihovo ponajprije u odrasloj dobi te starenju.

Stoga je bilo potrebno sva ispitivanja ponajprije provoditi s dovoljnim brojem lažno operiranih miševa Tlr2<sup>-/-</sup> genotipa kao kontrola koje bi ukazale na unaprijed postojeće razlike između njih i miševa divljeg tipa.

Takve su se blage, ali uoči jive unaprijed postojeće razlike pokazale u tjelesnoj težini i njenim promjenama mjesec dana nakon lažnog zahvata, odnosno u dobi od 4 mjeseca kad lažno operirani miševi divljeg tipa nastavljaju višestruko dobivati na težini, u usporedbi sa svojim Tlr2<sup>-/-</sup> parovima. Tlr2<sup>-/-</sup> miševi u dobi od 4 mjeseca pokazuju i blago smanjenje količine kretanja što se otkriva 28. dana ispitivanja nakon zahvata u ukupnom broju kretanja u Schallertovom cilindru te duljini održavanja na ubrzavajućem rotarodu. Kako navedene razlike nisu statistički značajne na korištenoj veličini uzorka, sve bi statistički značajne razlike nastale nakon MCAO ukazivale na presudan utjecaj manjka TLR2 isključivo nakon ishemijskog oštećenja.

Neurološki deficit se pokazao kao osjetljiva mjera za prisutnost ishemijskog oštećenja, ali nije bio dovoljno osjetljiv da na ispitivanoj veličini uzorka prikazuje značajne promjene u odnosu na genotip, kao što je uočeno kod ranije provedenih istraživanja (121).

Osjetljivost neurološkog deficita ovisi o subjektivnom pristupu zasljepljenog ispitanika a te zbog svog kratkog trajanja i malog opsega promatranja zahtjeva primjenu dodatnih testova

pona-anja. Ukoliko bi se mjera neurolo-kog deficita kod mi-eva htjela koristiti kao jedini alat promatranja pona-anja nakon MCAO, bilo bi potrebno produffiti vrijeme promatranja te uvesti dodatne kategorije kao -to su prisutnost epilepti kih napadaja, prisutnost nakostrije-ene dlake, nedostatak samotimarenja, oblik u-ki i sli no. Test kori-ten u ovom radu pokazao se kao tek brza orijentacija o stanju flivotinje koji mofle razlu iti je li flivotinja pretrpjela ishemiju mozga, je li dosegla humanu krajnju to ku ili kod ispitivanog mi-a ne postoji nikakvih vidljivih neurolo-kih simptoma.

Promatraju i grube parametre motori ke aktivnosti pomo u rotaroda i Schallertovog cilindra uo ava se odgo en razvitak motori kog o-te enja kod kod Tlr2-/- mi-eva s MCAO, koji se pri tom i nastavlja u kroni nu fazu oporavka.

Dok mi-evi divljeg tipa brzo razvijaju poreme aj osjeta naglo nakon ishemijskog o-te enja te se oporavljaju od istog unutar tjedan dana, poreme aj osjeta mjerem bilateralnom taktilnom stimulacijom od Tlr2-/- mi-eva je u po etku mnogo blafla, polagano se razvija doseflu i najve u vrijednost tek 7 dana nakon MCAO i potom se ne oporavlja, ve se nastavlja u preklapanju s motori kim poreme ajem.

Test obostranog podraffivanja dodirrom se pokazao dovoljno specifi nim za uo avanje izoliranog senzornog deficita, iako je postojala bojazan kako e on ostati maskiran izrazitim poreme ajima motorike nakon MCAO.

Takvi rezultati s blaflim i odgo enim nastupom o-te enja koje se potom nastavlja poja avati u kroni nu fazu, ukazuju na potrebu da se istraffe tkivni supstrati opaflenih zbivanja pomo u prikaza kapilarne i neuralne mreffe te biljega sinapsi.

### **6.3. TLR2 utječe na nastanak i grananje krvnih žila te ukazuje na povezanost puteva upale i angiogeneze**

Obzirom na opseg mikrocirkulacije i veli inu krvnih flila kod Tlr2-/- i WT mi-eva mofle se zaklju iti kako op a dostupnost hranjivih tvari mjesec dana nakon ishemijskog o-te enja nije umanjena kod Tlr2-/- te time ne predstavlja ograni avaju i imbenik u oporavku neuralne mreffe. No, na ene su promjene u parametrima mikrocirkulacije koje ukazuju na sporije sazrijevanje novonastalih krvnih flila te manji broj njihovih grananja. Ranija istraffivanja pokazuju da je TLR2 prisutan na endotelnim stanicama, te se mofle pretpostaviti kako bi signalni put TLR2 mogao utjecati na stvaranje imbenika angiogeneze (npr. imbenik rasta krvnih flila iz endotela, *engl. vascular endothelial growth factor*, VEGF) (93). Pored prou avanja utjecaja TLR-ova na angigenezu, ukazuje se potreba za ispitivanjem mikrovaskularne mreffe i u akutnim i subakutnim vremenskim to kama nakon ishemije gdje



bi se potencijalno mogle uoiti razlike u njenom opsegu kod Tlr2-/- flivotinja u odnosu na WT.

#### **6.4. Asimetrija neuralne mreže u podlozi neuroloških simptoma**

Promatraju i neuralnu mrežu pomoću YFP-a potaknutog Thy1 promotorom u kroničnoj vremenskoj točki od 28 dana nakon ishemijskog oštećenja, kod miševa divljeg tipa nije uočena razlika u optičkoj gustoći i izmjeni u zahvaćenim i nezahvaćenim moždanim polutkama, dok je zahvaljujući i blagom porastu IOD-a u nezahvaćenoj polutci te blagom padu IOD-a u zahvaćenoj polutci kod flivotinja bez TLR2 nastupila asimetrija sastavnica neuralne mreže. Takav nalaz odražava rezistenciju neuroloških simptoma kod Tlr2-/- miševa koji su ipak mnogo izraženiji od samog histološkog supstrata. Stoga je bilo potrebno analizirati dodatne parametre poput utjecaja TLR2 na apoptotski put koji utječe poglavito na brojnost neurona, te utjecaja TLR2 na izražavanje bjelancevina sinapsi.

#### **6.5. TLR2 dijeli signalni put s drugim receptorima upale**

Posebna odlika provedenih pokusa kojim se ispitivao izražavanje pojedinih sastavnica signalnog puta receptora TLR2 bila je mogućnost kvantifikacije prepisivanja mRNA za TLR2 koji kod Tlr2-/- flivotinja nije bio prisutan u svom funkcionalnom obliku.

Stoga je bilo moguće pratiti utjecaj manjka TLR2 na njegov vlastiti izražavanje.

Obzirom da se kod Tlr2-/- bazalne razine mRNA za TLR2 nisu promijenile, može se zaključiti kako u samom signalnom putu ne postoji potreba za nadoknadom neaktivnog receptora putem njegovog pojačanog izražavanja.

Dinamika izražavanja *Tlr2* je ranije opisana kod miševa s funkcionalnim TLR2 putem *in vivo* oslikavanja bioluminiscencije luciferazom potaknutom *Tlr2* promotorom transgeničnih *Tlr2-luc/gfp* miševa (62).

U ovom istraživanju potvrđena je identična dinamika izražavanja Tlr2 s akutnim porastom unutar 72 sata i maksimalnom vrijednošću tjedan dana nakon ishemije.

Načelno, prateći izražavanje *Tlr2* kod Tlr2-/- miševa nakon ishemijskog oštećenja nije uočena kompenzacija kroz snažnije prepisivanje *Tlr2*, već upravo suprotno, odgovor izražavanjem *Tlr2* bio je niži.

To je dovelo do zaključka da izražavanje *Tlr2* ne ovisi o prisutstvu djelatne bjelancevine TLR2, već o samom signalnom putu TLR2.

Receptori nalik na Toll (TLR-ovi) su općenito odgovorni za složeniju signalnu mrežu u imunosti, te međusobno ispreplitanje signalnih puteva različitih TLR-ova određuje razmjere i vrstu imunološkog odgovora.

Istraživanja drugih autora pokazala su kako su nakon ishemijskog oštećenja mozga u proizvodnji upalnih molekula uključeni i TLR2 i TLR4 (180).

Upravo iz tog razloga isključivanje *Tlr2* gena nije u potpunosti dokinulo njegov signalni put te je ostala očuvana pozitivna povratna sprema puta ovisnog o *Tlr2* i njegovog izražaja.

Obzirom da je ipak TLR2 glavni okidač tog puta, ostali aktivirajućih signala (TLR4) nisu bili dostatni da razina odgovora dostigne razine prisutne kod WT miševa nakon ishemijskog oštećenja.

Iako su bazalne razine skrivenih mRNA *Tlr2* kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa ostale iste, izražaj mnogih ispitanih gena signalnog puta TLR2 izmijenio je svoju bazalnu razinu kod *Tlr2*<sup>-/-</sup>, uključujući: *MyD88*, *Irak1*, *Irak4*, *Ikkkb*, *Irak3*, *Tollip*, *Tnf*, *Il6* i *Casp8*.

Pri tome se razine mRNA svih navedenih gena povećale, osim za mRNA *Irak3*. To ukazuje kako TLR2 uistinu važan u regulaciji izražaja signalnih gena u fiziološkim uvjetima u mozgu. Također, takvi rezultati pokazuju kako WT i *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševi nisu bili u potpunosti jednaki prije MCAO.

Stoga se uočene razlike u fenotipu prilikom analize *Tlr2*<sup>-/-</sup> nakon MCAO moraju razmatrati uzimajući u obzir navedena ograničenja usporedbe (116, 117, 181).

## 6.6. Adapterska bjelančevina MyD88 nadoknađuje manjak TLR2

Jedan od potencijalnih kandidata koji bi mogao utjecati na bazalne razine odabranih gena u mozgu prije MCAO je adapterska bjelančevina MyD88, koji posreduje u signalnom putu TLR-ova (svih osim TLR3) (182, 183).

Izražaj *Myd88* se povećao kod miševa divljeg tipa nakon ishemijskog oštećenja, no taj odgovor nije uočeno kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa. Pri tome je i razina *Myd88* kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa bila bazalno povećana.

Za MyD88 je otprilike poznato kako regulira izražaj *Tnf*-a kontrolirajući i aktivaciju p38 koja potom stabilizira *Tnf* transkripte (184).

Slično kao i kod MyD88, odgovor nakon ishemije je izostao kod apoptotičkog inhibitora FADD-a. On se povezuje s MyD88 svojom domenom za usmrivanje te predstavlja posrednika između puteva imunosti i apoptoze (118).

Jedno od mogućih objašnjenja ovog rezultata izostanka u porastu izražaja *Fadd*-a nakon MCAO kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> jest da izravno prati onaj MyD88.

Od gena odabranih za ispitivanje razine mRNA samo je *Nfkb1a* ostao nepromijenjenog izraflaja kod oba genotipa nakon ishemijskog o-te enja. Promjena je izostala i za *Il-6*, no samo u ipsilateralnoj hemisferi oba genotipa.

Ovim se testom nisu pokazale promjene za *Nfkb1a* i *Il-6* u akutnim vremenskim to kama, -to je u suprotnosti s ranijim istraflivanjima (117, 185).

Geni iji je irafraj mRNA bio smanjen nakon MCAO uklju ivali su *Irak1*, *Tollip* i *Ikkbb*, a pri tom su isti kod Tlr2-/- mi-eva bilo jo-vi-te uti-ani, odnosno smanjenog izraflaja.

### 6.7. Signalni put TLR2 presudan je za ravnotežu između upale i apoptoze

Preostali geni imali su poja ani izraflaj nakon MCAO, a to je uklju ivalo pozitivne regulatore signalnog puta ovisnog o TLR2 (*Irak4*, *Nfkb1*), citokine (*Tnf*, *Il1b* i njegov aktivator *Casp1*) te imbenik apoptoze *Casp8*. Za sve je navedene gene odgovor na ishemiju kod Tlr2-/- mi-eva bio smanjen u usporedbi s divljim tipom, osim za *Casp8*, gdje je razina mRNA *Casp8* vi-e porasla kod Tlr2-/- nego li kod WT nakon MCAO.

Prija-nja istraflivanja akutnog odgovora nakon MCAO su pokazala da su *Tlr2* i povezani geni uklju eni u upalni i apoptotiki odgovor poja anog izraflaja sve do 96 sati nakon reperfuzije (116, 117, 181).

Iako se u prethodnim istraflivanjima pokazalo kako su *Il-6* i *Il-1* vafni u akutnoj fazi oporavka nakon MCAO (62, 186-188), rezultati dobiveni u ovom radu identificiraju TNF kao najistaknutiji citokin koji je aktivan i u odgo enoj fazi oporavka.

Ve ina analiziranih gena je pokazala ve i odgovor na razini mRNA, a najzna ajniji odgovor vidi se tjedan dana nakon MCAO u usporedbi sa svim drugim vremenskim to akama.

U kroni noj vremenskoj to ki od mjesec dana posebno su bili nagla-eni izraflaji gena za *Casp8* i *Tnf*.

Ako se *Tnf* predstavlja kao klju ni predstavnik upalnog zbivanja, ovi rezultati potvr uju da upalni odgovor prati intenzitet signalnog puta TLR2 do u kroni nu fazu nakon MCAO (62).

Tovi-e, u slu aju kad TLR2 nije funkcionalan (Tlr2-/-), postojalo je jasno smanjenje odgovora u izraflaju *Tnf-a* -to ukazuje kako su mozgovi mi-eva Tlr2-/- genotipa imali manje upale u usporedbi sa svojim kontrolama divljeg tipa (189).

Tako er, prija-nja istraflivanja su pokazala smanjeni volumen ishemijskog o-te enja kod Tlr2-/- u ranoj fazi nakon ishemije (116, 121). Stoga smanjen upalni odgovor kod Tlr2-/- mofle uzrokovati smanjeni volumen ishemijskog o-te enja ili slijediti iz njega.

## 6.8. Manjak TLR2 dovodi do povećanja CASP8

Nasuprot tom smanjenju izražaja mRNA predstavnika upale (*Tnf*), *Casp8* je, kao predstavnik apoptoze, pokazao veći izražaj kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> u usporedbi s WT, osobito tijekom kronične faze oporavka.

Novije analize *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa potvrđuju da iako su akutna ishemijska oštećenja (24-72h) bila manja nego li kod WT miševa, infarcirani volumeni su bili veći i 7 dana nakon MCAO, kao i apoptoza neurona bez TLR2 (121).

Iako se smatra da manjak TLR2 uzrokuje manju upalu, što dovodi do povećanog izražaja *Casp8*, pojačane apoptoze u odgođanim vremenskim točkama te kasnijeg posljedičnog povećanja volumena oštećenja, moguće su i druga objašnjenja uzročna posljedično povezanosti navedenih događaja. Primjerice, izravan utjecaj manjka TLR2 na apoptozu i/ili odgođa u nastupu oštećenja.

Prikazani podaci, zajedno s ranijim istraffivanjima naglašavaju kako optimalan i vremenski određen imunološki odgovor utječe na apoptozu te je nuflan kako bi ograničio oštećenje neurona nakon moždanog udara.

## 6.9. Manjak TLR2 povećava izražaj biljega sinapsi i neuralnog stresa

Promatrajući razine bjelancevina koje su biljezi sinapsi, aksona i neuralnog stresa, pokazalo se kako je unatoč manjoj gustoći i neuralne mreže u korteksu ipsilateralne hemisfere, količina sinaptičkih bjelancevina u kroničnoj vremenskoj točki od 28 dana značajno veća kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa. Takav bi nalaz trebalo istraffiti na razini morfometrije neurona kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa prije i nakon ishemijskog oštećenja te bi samo rezultati na razini pojedinih stanica mogli objasniti radi li se o povećanom broju sinapsi po pojedinom ogranku neurona ili su ogranci brojniji i kraći te ne sadrže mnogo citoskeleta na lijevu pregradnju utječe GAP43.

Promatrajući GAP43 biljeg, pokazalo se kako on kod miševa divljeg tipa na razini bjelancevine uistinu prati dinamiku izražaja prikazanu bioluminiscencijom u prethodnim istraffivanjima (127), no ona je kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> izmijenjena s naglim povećanjem mjesec dana nakon ishemijskog oštećenja.

Na, istovremeno je prisutna i statistički značajno veća količina CASP3 koja, između ostalog, odražava i put CASP8 za lijevu mRNA je u pokusu real time rtPCR-a identificirano kako se povećava kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa nakon ishemijskog oštećenja (190).

Obzirom da manjak TLR2 utječe najintenzivnije upravo na CASP3, ta bi bjelanjčina mogla poslužiti kao pokazatelj neuralnog stresa ukoliko se uspostavi model u kojem se selektivno može prikazati populacija neurona, a to je upravo model transgeničnih Gap43-luc/gfp miševa.

#### **6.10. Koordinacija GAP43 i CASP3 u regulaciji oporavka nakon ishemijskog oštećenja**

Osnovna zbivanja po nastupu ishemijskog oštećenja uključuju aktivaciju molekularnih puteva povezanih s upalom i regeneracijom tkiva(121).

Kod odraslih sisavaca nakon ozljede moždane kore dolazi do odgovora pomoću pupanja aksona, pri čemu je GAP43 najintenzivnije izražena bjelanjčina koja promiče rast (138, 145, 191, 192). Kod glodavaca s MCAO, GAP43 je prisutan tijekom rane faze u flari-tu ishemijskog oštećenja, a potom u penumbri(192). To upućuje na ranu ulogu bjelanjčine GAP43 u spašavanju i regeneraciji tkiva. Kod trajne okluzije MCA, kad je oštećenje uslijed izostanka reperfuzije veće, GAP43 ne postoji u njenom flari-tu, no izražaj mu je povećan do 7 dana nakon ishemijske (193).

Rasvjetljavanje uloge GAP43 je napredovalo nedavnim otkrićem kako je GAP43 prisutan i na postsinaptičkoj membrani te može predstavljati supstrat za CASP3(143, 144). Postsinaptička lokacija bjelanjčine GAP43 premjestila je tefflu u razumijevanju njegove uloge s mehaničke elongacije stanica nastavaka prema složenijem podražavanju unutar stanica mreže potrebnih za oporavak tkiva.

Idući važan korak u rasvjetljavanju uloge bjelanjčine GAP43 i CASP3 nastupio je u trenutku kad se pokazalo da CASP3 može djelovati na 56 različitih supstrata u neuronu, te je, neovisno o GAP43, uključena u puteve povezane s kontrolom sastavnica citoskeleta neurona (npr. aktin, MAP2, Dbn i kalmodulin) (152).

To je dodalo novu dimenziju razumijevanju regeneracije nakon ishemijskog oštećenja: stanica na smrt je blisko povezana s produljavanjem novih stanica nastavaka i finim podražavanjem novostvorenih mehanizama stanica veza. Integriraju i navedene nove spoznaje, pretpostavljeno je kako su CASP3 i GAP43 uključeni u zajednički put tijekom ranog odgovora nakon ishemijskog oštećenja.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali kako se i GAP43 i CASP3 brzo i znakovito povećavaju u tkivu nakon MCAO te da su ta povećanja u pozitivnoj linearnoj korelaciji. Obzirom da je upala u središnjem živčanom sustavu vrlo složena, jedinstveno i teško reproducibilno zbivanje, bilo je potrebno svesti varijabilnost na najmanju moguću mjeru.

Neinvazivno pra enje bioluminiscencijom omogućilo je ponovne procjene lokalizacije i kvantifikacije staninog signala na istim flivotinjama.

Pojavni signal za GAP43 i CASP3 dobiven bioluminiscencijom je detaljno poduprt metodama imunohistokemije. Analiza je pokazala da pove anje intenziteta signala za GAP43 i CASP3 nije nastupilo uslijed pove anja broja stanica koje izraflavaju obje bjelanevine.

Takav nalaz navodi na zaklju ak da *Gap43* i *Casp3* pripadaju genima aktiviranim u najranijem stadiju nakon nastupa ishemijskog ote enja te da su stanice uklju ene u regenerativna zbivanja one koje posjeduju izraflaj oba gena, to je u suprotnosti s apoptozom.

Sli an je rezultat dobiven analizom kolokalizacije koja je pokazala da GAP43 prikazuje relativno visok izraflaj u odnosu na CASP3, mjere i prisutnost njegove reporterske bjelanevine GFP-a prvi dan nakon MCAO.

etiri dana nakon ishemijskog ote enja uslijedilo je pove anje i koli ine CASP3, no bez dodatnog pove anja broja stanica, to je imalo za posljedicu pove anu kolokalizaciju.

Na temelju dobivenih rezultata i u svjetlu ranijih istraflivanja, GAP43 i CASP3 mogu se smatrati pokazateljima intenzivne pregradnje neurona.

#### **6.11. Snimanje bioluminiscencije pomoću prosubstrata za luciferazu predstavlja neinvazivno utvrflivanje biomarkera upale i pregradnje**

Iako navedeni procesi nisu jo u potpunosti razvidni, mo flemo pretpostaviti model u kojem GAP43 djeluje kao rani signal za aksonogenezu nakon ega slijedi pove anje koli ine CASP3 koja u ovom slu aju ne djeluje proapoptotski, ve kao molekula koja kontrolira vbjelan evinu GAP43 kao svoj substrat.

Kolokalizacija unutar istog neurona ukazuje na vaflnost navedenih biljega u finom pode-avanju produflavanja aksona i reorganizacije citoskeleta, kao glavnim sastavnicama regeneracije sredi-njeg fliv anog sustava.

Pra enje njihove kolokalizacije neinvazivnom bioluminiscencijom predstavlja uvid u prostorno-vremenska zbivanja unutar mozga eksperimentalne flivotinje te time omogućuje primjenu potencijalno terapijskih postupaka i lijekova u specifi no definiranom trenutku, obzirom da i djelovanje pojedinih terapeutika usko zavisi o fazi odvijanja ishemijskog ote enja.

## 6.12. Odrednice za buduća istraživanja urođene imunosti nakon moždanog udara

### 6.12.1. Nedostaci provedenog znanstvenog istraživanja

Metoda izazivanja ishemijskog o-te enja putem MCAO kao standardizirani postupak ipak u sebi sadrži varijabilnost zahva enih područja mozga koja ponekad osim moždane kore uključuju hipokampus, amigdale i strijatum u različitim mjeri. Takva odstupanja možda odražavaju moždani udar prisutan kod ovjeka, no otežavaju usporedbu prilikom provo enja testova ponajviše.

Stoga je potrebno, pored kontrole protoka kroz teritorij MCAO pomoću MCAO, uvesti metode in vivo oslikavanja lezije visoke prostorne razlučivosti koja bi omogućila specifične zaključke testova ponajviše, ali i koregistraciju s drugim modalitetima in vivo oslikavanja koji ne podržavaju takvu razlučivost.

Primjena TTC bojanja ograničena je samo na prva 3 dana nakon ishemijskog o-te enja, nakon čega radi dolaska živih upalnih stanica na mjesto ishemije prestaje postojati o-tra granica koja do tad dijeli tkivo bez aktivnih dehidrogenaza čiji je TTC supstrat.

Stoga je potrebno sve uzorke mišjih mozgova pripremiti za imunohistokemiju analizirati pomoću bojanja krezil violetom. To nije bilo moguće na svim uzorcima u ovom istraživanju jer se tkivo mozga za određivanje razina bjelancevina i mRNA usitnjuje odmah po izolaciji.

Obzirom da TLR2 posreduje u upali koja može biti izazvana egzogenim patogenima, svaka epidemija zaraze u životinjskoj nastambi se odražava na njegovu aktivaciju. Kako bi se izbjegli takvi izvanjski utjecaji na rezultate, bilo je potrebno istovremeno imati dovoljan broj kontrolnih životinja koje bi služile kao pokazatelj promjena u okolišu. Kako to nije uvijek moguće radi ograničenog broja životinja, poboljšanje uvjeta u životinjskoj nastambi predstavljalo bi ključni element daljnjeg probovanja imunoloških zbivanja kod miševa.

Procjena neurološkog statusa prema Garcii se nije pokazala dovoljno osjetljivom za uočavanje senzomotoričkih simptoma koji su utvrđeni drugim testovima. Ukoliko bi se provodila kao samostalna metoda bihevioralne procjene neurološkog o-te enja bez dodatnog probovanja promatranja s parametrima izgleda i dugotrajnijeg promatranja koje bi uočilo eventualne epileptičke napade, te, mogla bi polučiti velik broj lažno negativnih rezultata.

Broj životinja uključeni u ispitivanje testova ponajviše onemogućavao je provo enje ispitivanja anksioznosti, emocionalnosti i radnog pamćenja (Y-labirint, otvoreno polje), obzirom da ona zahtijevaju u slučaju miševa kao eksperimentalne životinke najmanje 15 miševa po ispitivanoj skupini kako bi se donijeli valjani zaključci (194).

Prikaz neuralne mreže omogućuje uvid u sveukupnu količinu tijela neurona i njihovih nastavaka, no za preciznije utvrđivanje aksonalnog urastanja bilo bi potrebno koristiti specifične biljege aksona te po mogućnosti mjeriti njihovo urastanje iz kontralateralne hemisfere – to se postiže stereotaksijskom injekcijom biljega koji anterogradno putuju aksonima, kao što su dekstran amini obilježeni nekom od fluorescentnih proba.

U pokusu brojanja GAP43 pozitivnih stanica korišten je GFP kao neizravni fluorescentni reporter za prisutnost bjelancevine GAP43. Kako god, GFP se nakuplja u stanici i sporije razgrađuje od samog GAP43 te dobiveni signal ne mora u potpunosti odražavati trenutnu, već ukupnu izražaju GAP43 u flirotu svake pojedine stanice. Stoga bi preciznije bilo mjeriti GAP43 na histološkim rezovima protutijelima specifičnim za navedenu bjelancevinu, a GFP koristiti samo kao orijentir za stanice u kojima otkujemo signal.

#### **6.12.2. Odrednice za buduća istraživanja**

U skladu s navedenim nedostacima provedenog istraživanja, daljnja istraživanja na području urođene imunosti koja uključuju izazivanje ishemijskog oštećenja pomoću MCAO, trebala bi sadržavati neko od *in vivo* oslikavanja visoke prostorne razlučivosti, kao što su to magnetna rezonancija i mikro-kompjuterizirana tomografija kako bi se omogućilo razlikovanje flirotinja kojima su zahvaćene različite regije mozga.

Unaprijednje uvjeta u flirotinjskoj nastambi do razine slobodne za specifične patogene (*engl. Specific Pathogen Free, SPF*) isključivalo bi utjecaj vanjskih aktivatora receptora urođene imunosti, te bi bio potreban manji broj flirotinja kao kontrola, a kako tome bi se povisilo i preflivljenje flirotinja nakon MCAO obzirom da ne bi bile opterećene pratećom infekcijom (195).

Uključivanje većeg broja miševa u skupine za ispitivanje ponašanja presudno je za stjecanje zaključaka o njihovom radnom pamćenju, anksioznosti i emocionalnosti koja mogu također biti pod utjecajem signalnog puta TLR-ova. Stoga je za buduća ispitivanja, osim probiranja flirotinja sa zahvaćenim regijama amigdale i hipokampusu za navedene pokuse, potrebno formirati dovoljno velike skupine za ispitivanja poput Y-labirinta i otvorenog polja.



Prilikom posredne analize izraflaja gena od interesa putem sustava reporterske bjelan evine GFP-a, potrebno je uzeti u obzir njeno dugo vrijeme poluffivota te ga usporediti sa signalnom dobivenim specifi nim protutijelima za bjelan evinu od interesa. U suprotnom bi dobivene rezultate moglo biti te-ko tuma iti samo na temelju unutarstani nog nakupljanja GFP-a.

Obzirom na korisnost primjene prosubstrata za luciferazu u obliku Z-DEVD-aminoluciferina za orijentaciju u upalnim zbivanjima nakon ishemijskog o-te enja kod GAP43-luc/gfp mi-eva, daljnji bi smjer istraffivanja svakako uklju ivao primjenu istog postupka kod flivotinja koje imaju isklju en Tlr2 gen, odnosno na kriflanom soju izme u *Gap43/luc/GFP* i *Tlr2-/-* mi-eva.

Kako se bioluminiscencija pokazala iznimno jednostavnom i brzom metodom za pra enje izraflaja gena od interesa, njena budu a primjena uklju uje:

- stvaranje novih transgeni nih flivotinja po pitanju gena od interesa;
- stvaranje novih transgeni nih flivotinja s novim ciljnim enzimima;
- pra enja dinamike izraflaja nakon drugih oblika neurolo-kih o-te enja;
- stvaranje i razvoj novih prosupstrata i supstrata za ciljne bioluminiscentne enzime;
- razvoj novih pristupa u oslikavanju bioluminiscencije.

Kao metoda probira budu ih ciljnih molekula u istraffivanju mofdanog udara idealnom se pokazala tehnologiju DNA mikro ipa koja omogu uje pra enje diferencijalnog izraflaja na tisu e gena. Tako je, primjerice, dobiven uvid u poja avanje i uti-avanje izraflaja pojedinih gena po vremenskim to kama nakon ishemijskog o-te enja: 30 minuta unutar nastupa ishemije bili su poja ani geni neposrednog ranog odgovora (*engl. immediate early genes*), geni transkripcijskih faktora i bjelan evina toplinskog -oka (*engl. heat shock proteins*, HSPs). Slijedilo je poja avanje gena upale (primjerice imbenika aktivacije trombocita, *engl. platelet-activating factor*, PAF; imbenika nekroze tumora- , *engl. tumor necrosis factor-  $\alpha$* , TNF-  $\alpha$ ; i interleukin 1- , IL- 1 ), apoptoze, citoskeleta i metabolizma s vrhuncem izme u 4-24 sata. Neurotropni imbenici su pokazali odgo eno poja avanje s po etkom od 24h i trajanje do 7 dana nakon ishemije. Uti-ani su bili geni ionskih kanala i receptora za neurotransmitere unutar 8-24 sata, a potom su geni sinapti kih bjelan evina bili uti-ani 3-7 dana nakon MCAO (196).

Rezultati dobiveni tehnologijom oligonukleotignih mikro ipova imaju svoja ograni enja prilikom longitudinalnog pra enja izraflaja gena u vi-e vremenskih to aka, poglavito jer se

oslanjaju na promjene u odnosu na niske bazalne vrijednosti te je, u slučaju unaprijed prisutne mRNA, moguća pogrešna interpretacija rezultata (197).

Uobičajeno je potvrditi rezultate nekom od neovisnih tehnika poput RT-PCR-a, Northern blota ili Western blota. Pri tom se ne mogu svi geni analizirati svakom metodom verifikacije, jer sve potrebne sastavnice ne moraju biti dostupne, kao što su monoklonska protutijela potrebna za Western blot ili označene probe za RT-PCR (198).

Slofeni mehanizam upalnih zbivanja nakon nastupa ishemije ostavlja prostora za istraživanje njegove orkestracije od razine gena, preko mRNA, morfologije neurona, integracije modifkane kore pa sve do neuroloških simptoma i njihovog povlačenja.

### **6.12.3. Translacijska vrijednost istraživanja**

Rezultati ispitivanja naglašavaju kako je za oporavak nakon ishemijskog oštećenja potreban funkcionalan i pravovremeni upalni odgovor. Posljedica takvog odgovora je ograničavanje napredovanja oštećenja, te poticanje neuroregenerativnih mehanizama za što bržu ponovnu uspostavu neuronske mreže. Takva uloga imunoloških zbivanja, pokazuje da postishemijska upala nema jednoznačno negativan predznak.

Obzirom na zaključak kako TLR2 dijeli svoj signalni put s drugim receptorima, preporučuje se višedimenzionalnost terapijskog pristupa koji bi, osim agonista/antagonista jedne molekule, trebao u pravilno vremenski određenim prozorima ciljati na višepotencijalnih čimbenika koji bi istovremeno umanjivali apoptozu, a održavali ili pojačavali pregradnju neuronalnih nastavaka.

Iako se MyD88 pokazao kao integrator signalnih putova za TLR2 i TLR4, sve posljedice njegovog trajnog isključenja još nisu razjašnjene.

Doprinos ovog znanstvenog istraživanja u pogledu kliničkog pristupa predstavlja tkivno-molekularni temelj za pozitivna zbivanja u postishemijskoj upali, osobito u kasnijim fazama nakon nastupa ishemijskog oštećenja, kad bi dokidanje djelovanja TLR2 receptora usporilo oporavak neuroloških simptoma.

## 7. ZAKLJUČAK

### 7.1. OPĆI ZAKLJUČAK

Djelovanje TLR2 nakon ishemijskog o-te enja mi-je mozga potiče funkcionalni oporavak i ranu reaktivnu sinaptogenezu. Kod mi-eva divljeg tipa (C57Bl/6) u odnosu na mi-eve s onemogućenim *Tlr2* genom, nastup o-te enja je raniji i opsefniji, no i sam oporavak započinje bez odgode prisutne kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> mi-eva, dok se kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> oporavak odgađa i trajanje o-te enja se produljuje.

### 7.2. SPECIFIČNI ZAKLJUČCI

- I. Funkcionalni oporavak kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> mi-eva nastupa kasnije i njegovo se trajanje produljuje u odnosu na mi-eve divljeg tipa. To navodi na zaključak kako je TLR2 važan za dinamiku upale, intenziviraju je i dovode i do njene brže resolucije.
- II. Reaktivna sinaptogeneza je povećana u kroničnom stadiju oporavka (28 dana) nakon ishemijskog o-te enja u mi-je mozgu kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> mi-eva u odnosu na mi-eve divljeg tipa. To navodi na zaključak da učestvuje imunostima u procesu sinaptogeneze u kroničnoj fazi oporavka nakon moždanog udara.
- III. Gustoća neuralne mreže u kori zahvaćene polutke mi-je mozga nakon MCAO u kroničnom stadiju oporavka (28 dana) nakon ishemijskog o-te enja je smanjena kod mi-eva s onemogućenim *Tlr2* genom u odnosu na mi-eve divljeg tipa.
- IV. Usporeno je sazrijevanje krvnih žila te je smanjen broj njihovih grananja u kori zahvaćene polutke mi-je mozga nakon MCAO u kroničnom stadiju oporavka (28 dana) nakon ishemijskog o-te enja kod mi-eva s onemogućenim *Tlr2* genom u odnosu na mi-eve divljeg tipa.
- V. GAP43 i CASP3, zbog svoje izraženosti u o-te enom moždanom tkivu, predstavljaju biološke odrednice intenziteta upalnih zbivanja nakon ishemijskog o-te enja.

## 8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU

### ULOGA TLR2 U MODULACIJI SINAPTICKE PLASTICNOSTI I OPORAVKA POSLIJE ISHEMIJSKOGA OŠTEĆENJA MIJELEGA MOZGA

Dunja Gorup, 2016.

Osnovne odrednice postishemijske upale su signalni putevi urođene imunosti, od kojih su se najzastupljenijim pokazali putevi ovisni o TLR2 izraženim na stanicama mikroglije.

S ciljem određivanja djelovanja TLR2 na funkcionalni oporavak i reaktivnu sinaptogenezu, provedeno je istraživanje na modelu ishemijskog oštećenja mišjeg mozga s onemogućenim *Tlr2* genom (*Tlr2*<sup>-/-</sup>) pomoću okluzije središnje moždane arterije (*engl. Medial Cerebral Artery Occlusion, MCAO*) –to je omogućilo promatranje postishemijskih zbivanja na razini izražaja mRNA, bjelancevina i struktura tkiva te njihovog odraza na neurološke simptome.

Funkcionalno oštećenje mjereno testovima ponašanja kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa nastupa kasnije i u blažem obliku, te se njihov oporavak produljuje u odnosu na miševe divljeg tipa (*engl. Wild Type, WT*). Metodom qPCR-a uvrštene su promjene količine izražaja gena signalnog puta TLR2: *MyD88, FADD* i *Casp8*.

Western Blot za biljege sinapsi (DLG4, sinaptofizin) i biljeg aksonogeneze (GAP43) pokazao je promijenjen profil izražaja u akutnoj fazi te značajni porast mjesec dana nakon ishemije kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> u odnosu na WT miševe.

Gustoća neuralne mreže bila je smanjena kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa u odnosu na WT kontrole, kao i broj grananja krvnih žila sa sporijim sazrijevanjem mikrovaskularne mreže.

Utvrđeno je kako TLR2 utječe na dinamiku postishemijskog oporavka zajedno s neurološkim simptomima. Stoga terapijski potencijal leži u pravodobnoj modulaciji TLR2 odgovora. Pri tom je terapijski prozor moguće odrediti pomoću biljega neuralnog stresa CASP3 i GAP43.

## 9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU - SUMMARY

### THE ROLE OF TLR2 IN SYNAPTIC PLASTICITY AND FUNCTIONAL RECOVERY AFTER ISCHEMIC LESION OF MICE BRAIN

Dunja Gorup, 2016

Postischemic neuroinflammation depends on innate immunity that is predominantly relying on the TLR signaling.

To determine the role of TLR2 on the functional recovery and reactive synaptogenesis, research was conducted inducing ischemic brain lesions (MCAO) in mice lacking the *Tlr2* gene investigating postischemic events at the level of mRNA and protein expression, angiogenesis, neuronal network and neurological symptoms.

Functional deficits had later and more mild onset in *Tlr2*<sup>-/-</sup> mice and also displayed a prolonged chronic phase of recovery compared to wild type (WT). qRT-PCR revealed an increase in the mRNA expression of several components of the TLR2 signalling: MyD88, FADD and CASP8.

Western blot of synaptic markers (DLG4, synaptophysin) and a marker of axonogenesis (GAP43) revealed their changed profile in the acute phase and a significant increase in their expression 1 month after ischemia in *Tlr2*<sup>-/-</sup> mice compared to their WT controls.

Neuronal network density was lower in *Tlr2*<sup>-/-</sup> mice and they showed slower maturation of the microvascular network with lesser bifurcations, compared to the WT mice.

TLR2 was shown to influence the dynamics of postischemic recovery indicating a therapeutic potential of timed modulation of the TLR2 response. The therapeutic window can be determined using colocalisation of CASP3 and GAP43.

## 10. POPIS LITERATURE

1. World Health Organisation. *Cerebrovascular Disorders (Offset Publications)*. 1978.
2. Donnan, G.A. et al. *Stroke*. Lancet, 2008. 371(9624): 1612-23.
3. World Health Organisation. *International Classification of Diseases (ICD)*. 1990; Dostupno na: <http://www.who.int/classifications/icd/en/>.
4. World Health Organisation, C.f.D.C. *Atlas of Heart Disease and Stroke*. 2012.
5. World Health Organisation *Deaths from stroke*. 2015; Dostupno na: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/cvd\\_atlas\\_16\\_death\\_from\\_stroke.pdf?ua=1](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_16_death_from_stroke.pdf?ua=1).
6. Seshadri, S. et al. *The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study*. Stroke, 2006. 37(2): 345-50.
7. Feigin, V.L. et al. *Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2014. 383(9913): 245-54.
8. Zdravstvo, H.Z.Z.J. *Izješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2014. godini*. 2015; Dostupno na: [http://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/umrli\\_20141.pdf](http://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/umrli_20141.pdf).
9. Smajlovic, D. B. Kojic, et O. Sinanovic, *Five-year survival-after first-ever stroke*. Bosn J Basic Med Sci, 2006. 6(3): 17-22.
10. Kralj V, H.-fi.V. *Javnozdravstveni značaj kardiovaskularnih bolesti*. Kardio list, 2009. 3: 73-76.
11. World Health Organisation. *Economic Costs*. 2014; Dostupno na: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/cvd\\_atlas\\_17\\_economics.pdf?ua=1](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_17_economics.pdf?ua=1).
12. Thrift, A.G. et al. *Global stroke statistics*. Int J Stroke, 2014. 9(1): 6-18.
13. World Health Organisation *Estimated Deaths By Cause*. 2014; Dostupno na: <https://docs.google.com/spreadsheets/d/1XiJAJiNFEdIwtqm6xaCtU96m1DfPef8ieRHN2WmOVY/edit>.
14. Menken, M. T.L. Munsat, et J.F. Toole, *The global burden of disease study: implications for neurology*. Arch Neurol, 2000. 57(3): 418-20.
15. Rothwell, P.M. *The high cost of not funding stroke research: a comparison with heart disease and cancer*. Lancet, 2001. 357(9268): 1612-6.
16. Tracey, J.A. et al. *Mapping behavioral landscapes for animal movement: a finite mixture modeling approach*. Ecol Appl, 2013. 23(3): 654-69.
17. Stroke Therapy Academic Industry, R. *Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development*. Stroke, 1999. 30(12): 2752-8.
18. Macrae, I.M. *New models of focal cerebral ischaemia*. Br. J. clin. Pharmac. 1992. 34: 302-308.
19. Casals, J.B. et al. *The use of animal models for stroke research: a review*. Comp Med, 2011. 61(4): 305-13.
20. Garosi, L.S. et J.F. McConnell, *Ischaemic stroke in dogs and humans: a comparative review*. J Small Anim Pract, 2005. 46(11): 521-9.
21. Bacigaluppi, M. G. Comi, et D.M. Hermann, *Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia*. Open Neurol J, 2010. 4: 34-8.
22. Daniel I Slater, S.C.G. Tonya Marie Cook, Kristen L Burnham. *Middle Cerebral Artery Stroke*. Medscape 2015; Dostupno na: <http://emedicine.medscape.com/article/323120-overview>.
23. Yuan, F. et al. *Optimizing suture middle cerebral artery occlusion model in C57BL/6 mice circumvents posterior communicating artery dysplasia*. J Neurotrauma, 2012. 29(7): 1499-505.
24. Flecknell, P. *Replacement, reduction and refinement*. ALTEX, 2002. 19(2): 73-8.
25. Belayev, L. et al. *Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model*. Stroke, 1996. 27(9): 1616-22; discussion 1623.
26. Koizumi J, Y.Y. Nakazawa T, Ooneda G. *Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area*. Jpn J Stroke, 1986. 8: 1-8.

27. Grotta, J.C. et A.V. Alexandrov, *tPA-associated reperfusion after acute stroke demonstrated by SPECT*. Stroke, 1998. 29(2): 429-32.
28. Tamura, A. et al. *Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion*. J Cereb Blood Flow Metab, 1981. 1(1): 53-60.
29. Watson, B.D. et al. *Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis*. Ann Neurol, 1985. 17(5): 497-504.
30. Durukan, A. et T. Tatlisumak, *Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia*. Pharmacol Biochem Behav, 2007. 87(1): 179-97.
31. Aronowski, J. R. Strong, et J.C. Grotta, *Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats*. J Cereb Blood Flow Metab, 1997. 17(10): 1048-56.
32. Docol Corporation, D. *Doccol MCAO Sutures Reduce SD to 5% of Its Corresponding Mean Value for Infarction Volume*. 2015; Dostupno na: [http://www.doccol.com/information.php?info\\_id=22](http://www.doccol.com/information.php?info_id=22).
33. Katsura, K. T. Kristian, et B.K. Siesjo, *Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain*. Biochem Soc Trans, 1994. 22(4): 991-6.
34. Smith, W.S. *Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective*. J Vasc Interv Radiol, 2004. 15(1 Pt 2): S3-12.
35. Dereski, M.O. et al. *The heterogeneous temporal evolution of focal ischemic neuronal damage in the rat*. Acta Neuropathol, 1993. 85(3): 327-33.
36. Dirnagl, U. C. Iadecola, et M.A. Moskowitz, *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view*. Trends Neurosci, 1999. 22(9): 391-7.
37. Takano, K. et al. *Glycine site antagonist attenuates infarct size in experimental focal ischemia. Postmortem and diffusion mapping studies*. Stroke, 1997. 28(6): 1255-62; discussion 1263.
38. Dijkhuizen, R.M. et al. *Correlation between tissue depolarizations and damage in focal ischemic rat brain*. Brain Res, 1999. 840(1-2): 194-205.
39. McIlvoy, L.H. *The effect of hypothermia and hyperthermia on acute brain injury*. AACN Clin Issues, 2005. 16(4): 488-500.
40. Fujimura, M. et al. *Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion*. Brain Res, 1999. 842(1): 92-100.
41. De Keyser, J. et al. *Neuroprotection in acute ischemic stroke*. Acta Neurol Belg, 2005. 105(3): 144-8.
42. Ginsberg, M.D. *Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future*. Neuropharmacology, 2008. 55(3): 363-89.
43. Candelario-Jalil, E. *Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics*. Curr Opin Investig Drugs, 2009. 10(7): 644-54.
44. Ames, A. 3rd, et al. *Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon*. Am J Pathol, 1968. 52(2): 437-53.
45. Frank-Cannon, T.C. et al. *Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases?* Mol Neurodegener, 2009. 4: 47.
46. Kettenmann, H. et A. Verkhratsky, *Neuroglia: the 150 years after*. Trends Neurosci, 2008. 31(12): 653-9.
47. Jessen, K.R. et R. Mirsky, *Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein*. Nature, 1980. 286(5774): 736-7.
48. Rasband, M.N. *Glial Contributions to Neural Function and Disease*. Mol Cell Proteomics, 2016. 15(2): 355-61.
49. del Rio-Hortega P, P.W. *Cerebral Cicatrix: the Reaction of Neuroglia and Microglia to Brain Wounds*. Bulletin of the Johns Hopkins Hospital 1892. 41: : 2786303.
50. P, d.R.-H. *Microglia*, in *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*. 1937. 4816 534.
51. Hanisch, U.K. et H. Kettenmann, *Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain*. Nat Neurosci, 2007. 10(11): 1387-94.

52. Perry, V.H. D.A. Hume, et S. Gordon, *Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain*. Neuroscience, 1985. 15(2): 313-26.
53. Ginhoux, F. et al. *Origin and differentiation of microglia*. Front Cell Neurosci, 2013. 7: 45.
54. Lelekov-Boissard, T. et al. *Exploration of beneficial and deleterious effects of inflammation in stroke: dynamics of inflammation cells*. Philos Trans A Math Phys Eng Sci, 2009. 367(1908): 4699-716.
55. del Zoppo, G.J. *Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia*. Neuroscience, 2009. 158(3): 972-82.
56. Denes, A. et al. *Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2007. 27(12): 1941-53.
57. Neumann, J. et al. *Microglia provide neuroprotection after ischemia*. FASEB J, 2006. 20(6): 714-6.
58. Ekdahl, C.T. Z. Kokaia, et O. Lindvall, *Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia*. Neuroscience, 2009. 158(3): 1021-9.
59. Ceulemans, A.G. et al. *The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia*. J Neuroinflammation, 2010. 7: 74.
60. Lai, A.Y. et K.G. Todd, *Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions*. Can J Physiol Pharmacol, 2006. 84(1): 49-59.
61. Weston, R.M. et al. *Inflammatory cell infiltration after endothelin-1-induced cerebral ischemia: histochemical and myeloperoxidase correlation with temporal changes in brain injury*. J Cereb Blood Flow Metab, 2007. 27(1): 100-14.
62. Lalancette-Hebert, M. et al. *Live imaging of Toll-like receptor 2 response in cerebral ischaemia reveals a role of olfactory bulb microglia as modulators of inflammation*. Brain, 2009. 132(Pt 4): 940-54.
63. Tower, D.B. *The role of astroglia as modulators of neuronal function in cerebral cortex: comparative data, and observations in vivo and in vitro in fluid, electrolyte and amino acid interrelationships*. Vopr Biokhim Mozga, 1973. 8: 269-88.
64. Simard, M. et al. *Signaling at the gliovascular interface*. J Neurosci, 2003. 23(27): 9254-62.
65. Nedergaard, M. et U. Dirnagl, *Role of glial cells in cerebral ischemia*. Glia, 2005. 50(4): 281-6.
66. Chen, Y. et R.A. Swanson, *Astrocytes and brain injury*. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. 23(2): 137-49.
67. Hochachka, P.W. *Protons and glucose metabolism in shock*. Adv Shock Res, 1983. 9: 49-65.
68. Anderson, C.M. et R.A. Swanson, *Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions*. Glia, 2000. 32(1): 1-14.
69. Ridet, J.L. et al. *Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function*. Trends Neurosci, 1997. 20(12): 570-7.
70. Eng, L.F. R.S. Ghirnikar, et Y.L. Lee, *Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)*. Neurochem Res, 2000. 25(9-10): 1439-51.
71. Takizawa, S. et al. *Immunohistochemical localization of glutathione peroxidase in infarcted human brain*. J Neurol Sci, 1994. 122(1): 66-73.
72. Hewett, S.J. C.A. Csernansky, et D.W. Choi, *Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS*. Neuron, 1994. 13(2): 487-94.
73. Feuerstein, G.Z. X. Wang, et F.C. Barone, *The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma*. Neuroimmunomodulation, 1998. 5(3-4): 143-59.
74. Dong, Y. et E.N. Benveniste, *Immune function of astrocytes*. Glia, 2001. 36(2): 180-90.
75. Pekny, M. et M. Nilsson, *Astrocyte activation and reactive gliosis*. Glia, 2005. 50(4): 427-34.
76. Bush, T.G. et al. *Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice*. Neuron, 1999. 23(2): 297-308.
77. Silver, J. et J.H. Miller, *Regeneration beyond the glial scar*. Nat Rev Neurosci, 2004. 5(2): 146-56.
78. Kongsman, J.P. B. Drukarch, and A.M. Van Dam, *(Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology*. Clin Sci (Lond), 2007. 112(1): 1-25.



79. Felger, J.C. et al. *Brain dendritic cells in ischemic stroke: time course, activation state, and origin*. *Brain Behav Immun*, 2010. 24(5): 724-37.
80. Borregaard, N. *Neutrophils, from marrow to microbes*. *Immunity*, 2010. 33(5): 657-70.
81. Kriz, J. *Inflammation in ischemic brain injury: timing is important*. *Crit Rev Neurobiol*, 2006. 18(1-2): 145-57.
82. Yilmaz, G. et D.N. Granger, *Cell adhesion molecules and ischemic stroke*. *Neurol Res*, 2008. 30(8): 783-93.
83. Iadecola, C. et J. Anrather, *The immunology of stroke: from mechanisms to translation*. *Nat Med*, 2011. 17(7): 796-808.
84. Shichita, T. et al. *Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke*. *J Neurochem*, 2012. 123 Suppl 2: 29-38.
85. Gelderblom, M. et al. *Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke*. *Stroke*, 2009. 40(5): 1849-57.
86. Jin, R. G. Yang, et G. Li, *Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells*. *J Leukoc Biol*, 2010. 87(5): 779-89.
87. Vitkovic, L. S. Maeda, et E. Sternberg, *Anti-inflammatory cytokines: expression and action in the brain*. *Neuroimmunomodulation*, 2001. 9(6): 295-312.
88. Alberts B, J.A. Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. 2002, New York: Garland Science.
89. Nusslein-Volhard, C. et al. *A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of Drosophila*. *Nature*, 1980. 283(5746): 474-6.
90. Lemaitre, B. et al. *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. *Cell*, 1996. 86(6): 973-83.
91. Hashimoto, C. K.L. Hudson, et K.V. Anderson, *The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein*. *Cell*, 1988. 52(2): 269-79.
92. Gay, N.J. et F.J. Keith, *Drosophila Toll and IL-1 receptor*. *Nature*, 1991. 351(6325): 355-6.
93. Hopkins, P.A. et S. Sriskandan, *Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond*. *Clin Exp Immunol*, 2005. 140(3): 395-407.
94. Godfroy, J.I. 3rd, et al. *Isolated Toll-like receptor transmembrane domains are capable of oligomerization*. *PLoS One*, 2012. 7(11): e48875.
95. Sabroe, I. et al. *The role of TLR activation in inflammation*. *J Pathol*, 2008. 214(2): 126-35.
96. Heil, F. et al. *The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily*. *Eur J Immunol*, 2003. 33(11): 2987-97.
97. Matsumoto, M. et al. *Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells*. *J Immunol*, 2003. 171(6): 3154-62.
98. Ahmad-Nejad, P. et al. *Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments*. *Eur J Immunol*, 2002. 32(7): 1958-68.
99. Underhill, D.M. et al. *The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens*. *Nature*, 1999. 401(6755): 811-5.
100. Schreiber, G. et al. *Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy*. *Cancer Immunol Immunother*, 2010. 59(10): 1573-82.
101. Nilsen, N. et al. *Lipopolysaccharide and double-stranded RNA up-regulate toll-like receptor 2 independently of myeloid differentiation factor 88*. *J Biol Chem*, 2004. 279(38): 39727-35.
102. Fan, J. R.S. Frey, et A.B. Malik, *TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase*. *J Clin Invest*, 2003. 112(8): 1234-43.
103. Olson, J.K. et S.D. Miller, *Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs*. *J Immunol*, 2004. 173(6): 3916-24.
104. Tang, S.C. et al. *Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(34): 13798-803.
105. Marsh, B.J. R.L. Williams-Karnesky, et M.P. Stenzel-Poore, *Toll-like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke*. *Neuroscience*, 2009. 158(3): 1007-20.
106. Tsan, M.F. et B. Gao, *Endogenous ligands of Toll-like receptors*. *J Leukoc Biol*, 2004. 76(3): 514-9.

107. Saitoh, S. et al. *Ligand-dependent Toll-like receptor 4 (TLR4)-oligomerization is directly linked with TLR4-signaling*. J Endotoxin Res, 2004. 10(4): 257-60.
108. Medzhitov, R. *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. 1(2): 135-45.
109. Dabbagh, K. et D.B. Lewis, *Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses*. Curr Opin Infect Dis, 2003. 16(3): 199-204.
110. Takeda, K. et S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. 17(1): 1-14.
111. Kawai, T. et al. *Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes*. J Immunol, 2001. 167(10): 5887-94.
112. Marsh, B.J. *Preconditioning reprograms TLR signaling following cerebral ischemia the emergence of a neuroprotective program*, ed. S. Archive. Vol. Paper 408. 2008, Oregon.
113. Erridge, C. *Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants?* J Leukoc Biol, 2010. 87(6): 989-99.
114. Scheibner, K.A. et al. *Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2*. J Immunol, 2006. 177(2): 1272-81.
115. Funderburg, N. et al. *Human -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(47): 18631-5.
116. Lehnardt, S. et al. *Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia*. J Neuroimmunol, 2007. 190(1-2): 28-33.
117. Ziegler, G. et al. *TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 359(3): 574-9.
118. Aliprantis, A.O. et al. *The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2*. EMBO J, 2000. 19(13): 3325-36.
119. Koedel, U. et al. *Acute brain injury triggers MyD88-dependent, TLR2/4-independent inflammatory responses*. Am J Pathol, 2007. 171(1): 200-13.
120. Bohacek, I. et al. *Toll-like receptor 2 deficiency leads to delayed exacerbation of ischemic injury*. J Neuroinflammation, 2012. 9: 191.
121. Boha ek, I. *Uloga receptora TLR2 u odgovoru mozga nakon ishemijskoga oštećenja*. 2012, Zagreb: Sveu ili-te u Zagrebu.
122. Oliveira-Nascimento, L. P. Massari, et L.M. Wetzler, *The Role of TLR2 in Infection and Immunity*. Front Immunol, 2012. 3: 79.
123. Hayasaka, N. et al. *In vivo diagnostic imaging using micro-CT: sequential and comparative evaluation of rodent models for hepatic/brain ischemia and stroke*. PLoS One, 2012. 7(2): e32342.
124. Heiss, W.D. et al. *Dynamic penumbra demonstrated by sequential multitracer PET after middle cerebral artery occlusion in cats*. J Cereb Blood Flow Metab, 1994. 14(6): 892-902.
125. Seo, Y. et al. *Rodent brain imaging with SPECT/CT*. Med Phys, 2007. 34(4): 1217-20.
126. Thorek, D. et al. *Cerenkov imaging - a new modality for molecular imaging*. Am J Nucl Med Mol Imaging, 2012. 2(2): 163-73.
127. Gravel, M. Y.C. Weng, et J. Kriz, *Model system for live imaging of neuronal responses to injury and repair*. Mol Imaging, 2011. 10(6): 434-45.
128. Li, J. et al. *Cage the firefly luciferin! - a strategy for developing bioluminescent probes*. Chem Soc Rev, 2013. 42(2): 662-76.
129. Harvey, E.N. *A history of luminescence from the earliest times until 1900*, ed. T.A.P. Society. Vol. 44. 1957, Philadelphia.
130. Shimomura, O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*. 2012, Singapore: World Scientific Publishing.
131. Aldrich, S. *VivoGlo - Z-DEVD-Aminoluciferin*. 2015; Dostupno na: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/19504?lang=en&region=HR>.
132. Contag, C.H. et al. *Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts*. Mol Microbiol, 1995. 18(4): 593-603.
133. Samar Basu, L.W. *Studies on Experimental Models*. 2011, New York: Humana Press.

134. Cordeau, P. Jr. et al. *Live imaging of neuroinflammation reveals sex and estrogen effects on astrocyte response to ischemic injury*. Stroke, 2008. 39(3): 935-42.
135. Maysinger, D. et al. *Real-time imaging of astrocyte response to quantum dots: in vivo screening model system for biocompatibility of nanoparticles*. Nano Lett, 2007. 7(8): 2513-20.
136. Keller, A.F. M. Gravel, et J. Kriz, *Live imaging of amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: disease onset is characterized by marked induction of GFAP in Schwann cells*. Glia, 2009. 57(10): 1130-42.
137. Keller, A.F. M. Gravel, et J. Kriz, *Treatment with minocycline after disease onset alters astrocyte reactivity and increases microgliosis in SOD1 mutant mice*. Exp Neurol, 2011. 228(1): 69-79.
138. Carmichael, S.T. et al. *Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex*. Exp Neurol, 2005. 193(2): 291-311.
139. Aigner, L. et al. *Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice*. Cell, 1995. 83(2): 269-78.
140. Dent, E.W. et K.F. Meiri, *Distribution of phosphorylated GAP-43 (neuromodulin) in growth cones directly reflects growth cone behavior*. J Neurobiol, 1998. 35(3): 287-99.
141. Latchney, S.E. et al. *Developmental and adult GAP-43 deficiency in mice dynamically alters hippocampal neurogenesis and mossy fiber volume*. Dev Neurosci, 2014. 36(1): 44-63.
142. Shen, Y. et al. *Growth-associated protein-43 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system*. J Neurosci, 2002. 22(1): 239-47.
143. De la Monte, S.M. et al. *GAP-43 gene expression during development: persistence in a distinctive set of neurons in the mature central nervous system*. Brain Res Dev Brain Res, 1989. 46(2): 161-8.
144. Stroemer, R.P. T.A. Kent, et C.E. Hulsebosch, *Acute increase in expression of growth associated protein GAP-43 following cortical ischemia in rat*. Neurosci Lett, 1993. 162(1-2): 51-4.
145. Goto, S. et al. *Increased expression of growth-associated protein GAP-43/B-50 following cerebral hemitransection or striatal ischemic injury in the substantia nigra of adult rats*. Brain Res, 1994. 647(2): 333-9.
146. Li, Y. et al. *Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats*. Stroke, 1998. 29(9): 1972-80; discussion 1980-1.
147. Martzen, M.R. et al. *Altered phosphorylation of growth-associated protein B50/GAP-43 in Alzheimer disease with high neurofibrillary tangle density*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(23): 11187-91.
148. Teunissen, C.E. et al. *Growth-associated protein 43 in lesions and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2006. 32(3): 318-31.
149. Parhad, I.M. R. Oishi, et A.W. Clark, *GAP-43 gene expression is increased in anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis*. Ann Neurol, 1992. 31(6): 593-7.
150. Ikemoto, A. A. Hirano, et I. Akiguchi, *Increased expression of growth-associated protein 43 on the surface of the anterior horn cells in amyotrophic lateral sclerosis*. Acta Neuropathol, 1999. 98(4): 367-73.
151. Perrin, F.E. et al. *No widespread induction of cell death genes occurs in pure motoneurons in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model*. Hum Mol Genet, 2005. 14(21): 3309-20.
152. Han, M.H. et al. *The novel caspase-3 substrate Gap43 is involved in AMPA receptor endocytosis and long-term depression*. Mol Cell Proteomics, 2013. 12(12): 3719-31.
153. O'Brien, M.A. et al. *Homogeneous, bioluminescent protease assays: caspase-3 as a model*. J Biomol Screen, 2005. 10(2): 137-48.
154. Canadian Council on Animal Care (CCAC). *Guide to the care and use of experimental animals*. 1993, ©Canadian Council on Animal Care,; Canada.
155. Charles River. *C57Bl/6 Mice*. 2015; Dostupno na: <http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/c57bl-6n-mouse>.
156. Laboratory, T.J. *Tlr2-/- mice*. 2015; Dostupno na: <https://www.jax.org/strain/004650>.

157. Porrero, C. et al. *Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice*. Brain Res, 2010. 1345: 59-72.
158. Laboratory, T.J. *Mouse strain Data Sheet Thy1-YFP*. 2015; Dostupno na: <https://www.jax.org/strain/003709>.
159. Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. 1999, Washington (DC): ); 2009. National Academies Press (US).
160. Miyazawa, T. et al. *Effect of mild hypothermia on focal cerebral ischemia. Review of experimental studies*. Neurol Res, 2003. 25(5): 457-64.
161. Rousselet, E. J. Kriz, et N.G. Seidah, *Mouse model of intraluminal MCAO: cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining*. J Vis Exp, 2012(69).
162. Lee, R.M. *Morphology of cerebral arteries*. Pharmacol Ther, 1995. 66(1): 149-73.
163. Garcia, J.H. et al. *Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation*. Stroke, 1995. 26(4): 627-34; discussion 635.
164. Schallert, T. et al. *CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury*. Neuropharmacology, 2000. 39(5): 777-87.
165. Tennant, K.A. et T.A. Jones, *Sensorimotor behavioral effects of endothelin-1 induced small cortical infarcts in C57BL/6 mice*. J Neurosci Methods, 2009. 181(1): 18-26.
166. Starkey, M.L. et al. *Assessing behavioural function following a pyramidotomy lesion of the corticospinal tract in adult mice*. Exp Neurol, 2005. 195(2): 524-39.
167. Lalancette-Hebert, M. et al. *Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain*. J Neurosci, 2007. 27(10): 2596-605.
168. Elmer, P. 2015.
169. Goldlust, E.J. et al. *Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains*. Stroke, 1996. 27(9): 1657-62.
170. Kramer, M. et al. *TTC staining of damaged brain areas after MCA occlusion in the rat does not constrict quantitative gene and protein analyses*. J Neurosci Methods, 2010. 187(1): 84-9.
171. Benedek, A. et al. *Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats*. Brain Res, 2006. 1116(1): 159-65.
172. Engel, O. et al. *Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model*. J Vis Exp, 2011(47).
173. Meisel, C. et al. *Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke*. Stroke, 2004. 35(1): 2-6.
174. Liauw, J. et al. *Thrombospondins 1 and 2 are necessary for synaptic plasticity and functional recovery after stroke*. J Cereb Blood Flow Metab, 2008. 28(10): 1722-32.
175. D'Amelio, M. V. Cavallucci, et F. Cecconi, *Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death*. Cell Death Differ, 2010. 17(7): 1104-14.
176. Aswendt, M. et al. *Boosting bioluminescence neuroimaging: an optimized protocol for brain studies*. PLoS One, 2013. 8(2): e55662.
177. Slee, E.A. C. Adrain, et S.J. Martin, *Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis*. J Biol Chem, 2001. 276(10): 7320-6.
178. Walsh, J.G. et al. *Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(35): 12815-9.
179. International Mouse Phenotyping Consortium. 2015; Dostupno na: <http://www.mousephenotype.org/>.
180. Brea, D. et al. *Toll-like receptors 2 and 4 in ischemic stroke: outcome and therapeutic values*. J Cereb Blood Flow Metab, 2011. 31(6): 1424-31.
181. Lehnardt, S. et al. *TLR2 and caspase-8 are essential for group B Streptococcus-induced apoptosis in microglia*. J Immunol, 2007. 179(9): 6134-43.
182. Lim, J.E. et al. *MyD88 deficiency ameliorates beta-amyloidosis in an animal model of Alzheimer's disease*. Am J Pathol, 2011. 179(3): 1095-103.

183. Lim, J.E. et al. *The effects of MyD88 deficiency on exploratory activity, anxiety, motor coordination, and spatial learning in C57BL/6 and APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice*. Behav Brain Res, 2012. 227(1): 36-42.
184. Han, J. *MyD88 beyond Toll*. Nat Immunol, 2006. 7(4): 370-1.
185. Minami, M. [*Neuro-glio-vascular interaction in ischemic brains*]. Yakugaku Zasshi, 2011. 131(4): 539-44.
186. Hill, J.K. et al. *Temporal modulation of cytokine expression following focal cerebral ischemia in mice*. Brain Res, 1999. 820(1-2): 45-54.
187. Clausen, B.H. et al. *A quantitative in situ hybridization and polymerase chain reaction study of microglial-macrophage expression of interleukin-1beta mRNA following permanent middle cerebral artery occlusion in mice*. Neuroscience, 2005. 132(4): 879-92.
188. Babcock, A.A. et al. *Toll-like receptor 2 signaling in response to brain injury: an innate bridge to neuroinflammation*. J Neurosci, 2006. 26(49): 12826-37.
189. McCoy, M.K. et M.G. Tansey, *TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease*. J Neuroinflammation, 2008. 5: 45.
190. Kruidering, M. et G.I. Evan, *Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"?* IUBMB Life, 2000. 50(2): 85-90.
191. Hulsebosch, C.E. et al. *Traumatic brain injury in rats results in increased expression of Gap-43 that correlates with behavioral recovery*. Neurosci Lett, 1998. 255(2): 83-6.
192. Farooque, M. et al. *Changes of extracellular levels of amino acids after graded compression trauma to the spinal cord: an experimental study in the rat using microdialysis*. J Neurotrauma, 1996. 13(9): 537-48.
193. Miyake, K. et al. *Alterations in hippocampal GAP-43, BDNF, and LI following sustained cerebral ischemia*. Brain Res, 2002. 935(1-2): 24-31.
194. Wietrzych, M. et al. *Working memory deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice*. Learn Mem, 2005. 12(3): 318-26.
195. Festing, M.F. et D.K. Blackmore, *Life span of specified-pathogen-free (MRC category 4) mice and rats*. Lab Anim, 1971. 5(2): 179-92.
196. Lu, X.C. et al. *Microarray analysis of acute and delayed gene expression profile in rats after focal ischemic brain injury and reperfusion*. J Neurosci Res, 2004. 77(6): 843-57.
197. Satoh, J. et al. *Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis*. Neurobiol Dis, 2005. 18(3): 537-50.
198. Jaluria, P. et al. *A perspective on microarrays: current applications, pitfalls, and potential uses*. Microb Cell Fact, 2007. 6: 4.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1984. godine u Zagrebu. 2008. sam diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a 2009. obavila jednogodišnji pripravnički staž doktora u Klinici koja je bolnica Dubrava u Zagrebu te 2011. položila stručni ispit.

Od 2009. sam zaposlena na Zavodu za histologiju i embriologiju kao stručna suradnica na projektu prof. dr. sc. Srećka Gajovića „Regeneracija i plastičnost nakon ishemijskog oštećenja mozga proučavana na inovativnim transgenim mišjim modelima“, u sklopu kojeg sam u 3 navrata boravila u laboratoriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Laval, Quebec City, Kanada, pod vodstvom prof. dr. sc. Jasne Krifl. 2010. sam izabrana u zvanje asistenta na Katedri za histologiju i embriologiju, a od 2013. sam suradnica na projektu EUP7 GlowBrain prof. dr. sc. Srećka Gajovića.

Autorica sam 4 CC indeksirane znanstvene rada te 9 saopćenja na međunarodnim kongresima. Dodijeljena mi je nagrada za najbolje predstavljanje rada „Uloga gena koji reguliraju kortikogenezu tijekom popravka i regeneracije mozga nakon ishemije“ na Forumu mladih neuroznanstvenika, Young Neuroscientists Forum Ljubljana '13., što je rezultat rada na bilateralnom projektu MZOS-a i njemačkog DAAD-a. Dobitnica sam i stipendije FENS-a (*Federation of Neuroscience Societies*), 2014. za mlade istraživače.

Posjedujem dozvolu privatnog pilota jednomotornog zrakoplova i skipera jedrilice, te sam kategorizirana sportašica u boksu i triatlonu od strane Hrvatskog olimpijskog odbora.

### Popis publikacija:

#### Originalni znanstveni radovi

- I. **Gorup D**, Bohaček I, Miličević T, Pochet R, Mitrešić D, Krifl J, Gajović S. Increased expression and colocalization of GAP43 and CASP3 after brain ischemic lesion in mouse. *Neurosci Lett*. 2015 Jun 15;597:176-82.
- II. Winters L, Winters T, **Gorup D**, Mitrešić D, Curlin M, Krifl J, Gajović S. Expression analysis of genes involved in TLR2-related signaling pathway: Inflammation and apoptosis after ischemic brain injury. *Neuroscience*. 2013 May 15;238:87-96.
- III. Dobrivojević M, Bohaček I, Erjavec I, **Gorup D**, Gajović S. Computed microtomography visualization and quantification of mouse ischemic brain lesion by nonionic radio contrast agents. *Croat Med J*. 2013 Feb;54(1):3-11.
- IV. Bohaček I, Cordeau P, Lalancette-Hébert M, **Gorup D**, Weng YC, Gajović S, Kriz J. Toll-like receptor 2 deficiency leads to delayed exacerbation of ischemic injury. *J Neuroinflammation*. 2012 Aug 8;9:191-198.

## Kongresni saopćenici

- I. **Gorup D**, Boha ek I, Mili evi T, Pochet R, Mitre i D, Krifl J, Gajovi S (2015) The role of developmentally active genes in postischemic recovery. 4th Croatian Congress of Neuroscience, Split, Croatia, September 17-19, 2015, 42-43
- II. **Gorup D**, Gajovi S, Rosario M (2013) The role of corticogenesis-regulating genes during brain repair and regeneration after ischemia. SNCø13 SiNAPSA Neuroscience Conferenceø13, Ljubljana, Slovenia, September 27-29, 2013, 57
- III. **Gorup D**, Gajovi S, De Rocha M (2013) Corticogenesis controlling genes in the brain repair and regeneration after ischemic lesion in the mouse. 4th Croatian Congress of Neuroscience, Zagreb, Croatia, September 20-21 2013, 36
- IV. **Gorup D**, Boha ek I, Lalancette-Hebert M, Weng YC, Gajovi S, Krifl J (2011) Influence of TLR2 on synaptic plasticity after ischemic lesion in a longitudinal study of mice brain recovery. SNCø11 SiNAPSA Neuroscience Conferenceø11 Central European FENS Featured Regional Meeting, Ljubljana, Slovenia, September 22-25, 2011
- V. Boha ek I, **Gorup D**, Lalancette-Hebert M, Weng YC, Gajovi S, Krifl J (2009) Immune response and the modulation of post-ischemic neurogenesis. Annual Meeting of Croatian Society for Microscopy, Zagreb, Croatia, December 11, 2010
- VI. **Gorup D**, Boha ek I, Lalancette-Hebert M, Weng YC, Gajovi S, Krifl J (2010) Synaptic plasticity after ischemic lesion in a longitudinal study of mice brain recovery. COST B30 - Training School Cellular Neuropathology: in vitro models Kiev, Ukraine, 3 ó 7 June 2010
- VII. Boha ek I, **Gorup D**, Lalancette-Hebert M, Weng YC, Gajovi S, Krifl J (2010) The relation between postischemic neurogenesis and TLR2 ó a mediator of innate immune response. COST-B30 Stem Cells and Neuroregeneration, Haarlem, the Netherlands, February 5-6, 2010
- VIII. Boha ek I, **Gorup D**, Lalancette-Hebert M, Weng YC, Gajovi S, Krifl J (2009) Immune response and the modulation of post-ischemic neurogenesis. 3rd Croatian Congress of Neuroscience, Zadar, Croatia, September 24-26, 2009, 50
- IX. Gajovi S, Mitre i M, Boha ek I, Dobrivojevi M, **Gorup D**, Kapuralin K, Mavri S, and Kostovi -Knefevi LJ (2009) Signal transducing adaptor molecule (STAM2) is expressed in the mouse during embryo development and in the adult brain. Microscopy Conference in Graz , Austria, August 30 ó September 4, 2009
- X. Gajovi S, Mitre i M, Boha ek I, Dobrivojevi M, **Gorup D**, Kapuralin K, Mavri S, and Kostovi -Knefevi LJ (2009) Signal transducing adaptor molecule (STAM2) is expressed in the mouse during embryo development and in the adult brain. EMBO Young Scientists Forum, Zagreb, Croatia, June 15-17, 2009