

# Promjene perineuronskih mreža u mozgu štakora nakon kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije

---

Trnski, Sara

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:105:097696>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-21**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Sara Trnski**

**Promjene perineuronskih mreža u  
mozgu štakora nakon kontrolirane  
kratkotrajne perinatalne hipoksije**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2022.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Sara Trnski**

**Promjene perineuronskih mreža u  
mozgu štakora nakon kontrolirane  
kratkotrajne perinatalne hipoksije**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2022.**

Disertacija je izrađena na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Nataša Jovanov-Milošević



Istraživanje je financirano sljedećim projektima:

1. "Razvoj karijera mladih istraživača - izobrazba novih doktora znanosti" (HRZZ, DOK 2018-01-3771, voditeljica projekta prof. dr. sc. Nataša Jovanov-Milošević);
2. "Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi", ZCI-Neuro (GA KK.01.1.1.01.0007, voditelj projekta prof. dr. sc. Miloš Judaš);
3. "Moždani izvanstanični matriks u razvitku i perinatalnoj hipoksiji" (HRZZ, IP-2019-04-3182, voditeljica projekta prof. dr. sc. Nataša Jovanov-Milošević);
4. Sveučilišna potpora (BM0054, voditeljica projekta prof. dr. sc. Nataša Jovanov-Milošević).



**HRZZ**  
Hrvatska zaklada  
za znanost



## ZAHVALA

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Nataši Jovanov-Milošević na pruženoj prilici, svim savjetima, nesebičnoj pomoći i vođenju kroz izradu ove disertacije, ali i kroz moj rani karijerni put i razvoj. Izuzetna mi je čast što sam imala priliku izraditi svoju disertaciju u cijenjenoj znanstvenoj instituciji kao što je Hrvatski institut za istraživanje mozga, ali još veća čast i privilegija mi je to što ste baš Vi moja mentorica.*

*Također, zahvaljujem svim kolegicama i kolegama, odnosno prijateljima s HIIM-a, s kojima sam dijelila i dobre i loše trenutke koje sa sobom nosi izazov kao što je doktorat. Hvala svima što ste mi na bilo koji način pomogli da ostvarim svoj cilj. Posebno bih izdvojila Mihaelu – hvala ti za sve. Sretna sam što sam pronašla takvu prijateljicu koja je uvijek spremna pomoći, koja je tu i kad sve ide kako treba, ali i kada sve krene nizbrdo. Hvala ti što si me spašavala kada je sve izgledalo izgubljeno. Hvala Ivanu na svim savjetima, vremenu i trudu, tvoje sugestije zasigurno su oplemenile ovu disertaciju. Također, hvala mojim supatnicima iz R-022 bez vas – Dinko, Ema, Tila, ovo iskustvo ne bi bilo isto. Hvala mojoj dragoj Lei za sve savjete, što sam uvijek mogla računati na tebe i što sam s tobom mogla dijeliti i dobro i loše, to mi puno znači.*

*Zahvaljujem i svim tehničarkama koje su mi pomagale i svojim radom omogućile da se izrada ove disertacije odvija prema planu. Hvala Nataši, Valentini i Maji na brizi oko laboratorijskih životinja, Danici na pomoći s parafinskim blokovima, Božici i Maji na vremenu i trudu koje su uložile u sve imunice čiji su rezultati prikazani u ovoj disertaciji.*

*Zahvaljujem Mihaeli Štefanec na lektoriranju ovog doktorskog rada.*

*Najveća hvala mojoj obitelji – mojim roditeljima Božici i Mladenu što su me uvijek poticali na to da budem svoja, da ne odustajem od svojih snova i da su samo zvijezde granica. Hvala vam na nesebičnoj podršci, što ste uvijek stavljali moje potrebe ispred svojih, što ste najbolji roditelji. Nadam se da vas neću razočarati. Hvala mojim sestrama Slađani i Ani na podršci i osloncu. Znam da na vas uvijek mogu računati. Hvala mom Mladenu – hvala ti na razumijevanju, strpljenju, toleranciji i bezuvjetnoj podršci. S tobom je svaki izazov lak. A ti, mali moj Zeuse, moja si najveća inspiracija i motivacija za rad sa životinjama. U tebi je utkana sva moja bezgranična ljubav prema svim životinjama.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Perineuronske mreže.....	1
1.2. Perinatalna hipoksijsko-ishemijska ozljeda mozga .....	6
1.3. Animalni modeli HI ozljede mozga.....	11
1.4. Svrha rada .....	19
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	<b>20</b>
<b>3. CILJEVI RADA</b> .....	<b>21</b>
3.1. Opći cilj .....	21
3.2. Specifični ciljevi .....	21
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>22</b>
4.1. Materijali .....	22
4.2. Metode .....	27
4.2.1. Izlaganje štakora P1 uvjetima kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije.....	27
4.2.2. Mjerenje acidobaznog statusa .....	28
4.2.3. Testiranje ponašanja.....	29
4.2.4. Žrtvovanje štakora P1 i P105.....	29
4.2.5. Priprema moždanog tkiva za histološke i imunohistokemijske analize.....	30
4.2.6. Histološke i imunohistokemijske metode .....	31
4.2.7. Kvalitativne i kvantitativne metode obrade rezultata .....	36
4.2.8. Statistička analiza.....	37
<b>5. REZULTATI</b> .....	<b>39</b>
5.1. Klinička slika štakora P1 u uvjetima hipoksije .....	39

5.2. Izvanstanični i stanični supstrat hipoksijske ozljede u mozgu štakora P1 nakon perinatalne hipoksije.....	39
5.2.1. Acidobazna ravnoteža nakon perinatalne hipoksije.....	39
5.2.2. Promjene u morfologiji mikroglijalnih stanica i makrofaga u moždanoj kori cingularne vijuge, žuljevitom tijelu i subventrikularnoj zoni 8 sati i 24 sata nakon perinatalne hipoksije .....	41
5.3. Kvalitativne i kvantitativne promjene PNN-ova u zreloj moždanoj kori cingularne vijuge i hipokampusu u mozgu štakora P105 nakon perinatalne hipoksije.....	43
5.3.1. Promjene u morfologiji, razmještaju, broju i molekularnim sastavnicama PNN-ova u MCC-u i RSC-u uz normotipični perinatalni razvitak i nakon perinatalne hipoksije.....	43
5.3.2. Promjene u morfologiji, razmještaju, broju i molekularnim sastavnicama PNN-ova u hipokampusu uz normotipični perinatalni razvitak i nakon perinatalne hipoksije .....	64
5.4. Promjene u ponašanju mladih (P30) i odraslih (P70) štakora .....	90
<b>6. RASPRAVA.....</b>	<b>91</b>
6.1. Neposredni učinak perinatalne hipoksije na acidobazni status i mikroglijalne stanice u novorođenih štakora .....	92
6.2. Učinak perinatalne hipoksije na kvalitativne i kvantitativne promjene PNN-ova u zreloj moždanoj kori cingularne vijuge i hipokampusu .....	94
6.3. Učinak perinatalne hipoksije na promjene u morfologiji, razmještaju, broju i molekularnim sastavnicama PNN-ova – agrekanu, versikanu i neurokanu, u MCC-u i hipokampusu.....	96
6.4. Povezanost promjena PNN-ova nastalih nakon perinatalne hipoksije s odstupanjima u lokomotornoj aktivnosti i spoznajnim sposobnostima .....	99
<b>7. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>103</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>105</b>
<b>9. SUMMARY.....</b>	<b>106</b>
<b>10. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>107</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>129</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

ACC – od engl. *anterior cingulate cortex*, prednja moždana kora cingularne vijuge

BE, ecf – od engl. *base excess, extracellular fluid*, višak lužina u izvanstaničnoj tekućini

CA – od lat. *Cornu Amonis*, Amonov rog

CA1 – od engl. *field CA1 of the hippocampus*, polje Amonovog roga 1 hipokampusa

CA2 – od engl. *field CA2 of the hippocampus*, polje Amonovog roga 2 hipokampusa

CA3 – od engl. *field CA3 of the hippocampus*, polje Amonovog roga 3 hipokampusa

CC – od lat. *corpus callosum*, žuljevito tijelo

CCAO – od engl. *common carotid artery occlusion*, okluzija zajedničke karotidne arterije

CD68 – štakorski CD68 klon ED1, pan-makrofagni biljeg u štakora

CG – od engl. *cingulate cortex*, moždana kora cingularne vijuge

ChABC – od engl. *chondroitinase ABC*, enzim hondroitinaza ABC

GAG – od engl. *glycosaminoglycan*, glikozaminoglikan

CSPG – od engl. *chondroitin sulfate proteoglycans*, hondroitin sulfat proteoglikani

Df – od engl. *dorsal fornix*, dorzalni forniks hipokampusa

Dhc – od engl. *dorsal hippocampal commissure*, dorzalna hipokampalna komisura

DTI – od engl. *diffusion tensor imaging*, difuzijska traktografska metoda snimanja

ECM – od engl. *extracellular matrix*, izvanstanična tvar

GABA – od engl. *gamma-aminobutyric acid*, gama-aminomaslačna kiselina

GD – od lat. *gyrus dentatus*, nazubljena vijuga

GrDG – od engl. *granular layer dentate gyrus*, zrnati sloj nazubljene vijuge

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> – bikarbonati

HI – hipoksijsko-ishemijska

Hif – od engl. *hippocampal fissure*, hipokampalna pukotina

Iba-1 – od engl. *ionized calcium-binding adapter molecule 1*, specifični proteini kalcijevih iona, biljeg mikroglije

IF – imunofluorescencija

IHC – od engl. *immunohistochemistry*, imunohistokemija

LMol – od lat. *stratum lacunosum moleculare*, sloj, stratum lacunosum moleculare

M – mužjak

MCAO – od engl. *middle cerebral artery occlusion*, okluzija srednje moždane arterije

MCC – od engl. *midcingulate cortex*, srednja moždana kora cingularne vijuge

MoDG – od engl. *molecular layer dentate gyrus*, molekularni sloj nazubljene vijuge

MRI – od engl. *magnetic resonance imaging*, magnetska rezonancija

MRS – od engl. *magnetic resonance spectroscopy*, magnetna spektroskopija

MWM – od engl. *Morris water maze*, Morisov vodeni labirint

NeuN – od engl. *neuronal nuclear antigen*, nuklearni biljeg zrelih neurona

Or – od lat. *stratum oriens*, sloj, stratum oriens

P – postnatalni dan

$p^{\text{ATM}}$  – od engl. *atmospheric pressure*, atmosferski tlak

PBS – od engl. *phosphate buffered saline*, otopina fosfatnog pufera

$\text{PCO}_2$  – od engl. *partial pressure of CO<sub>2</sub>*, parcijalni tlak ugljikovog dioksida

pH – od engl. *potential of hydrogen*, vodikov potencijal

PNN – od engl. *perineuronal nets*, perineuronske mreže

$\text{PNN}/\text{mm}^2$  – broj perineuronskih mreža (od engl. *perineuronal nets*) po milimetru kvadratnom (<sup>2</sup>)

pO<sub>2</sub> – od engl. *partial pressure of O<sub>2</sub>*, parcijalni tlak kisika

PoDG – od engl. *polymorph layer dentate gyrus*, polimorfni sloj nazubljene vijuge

Py – od lat. *stratum pyramidale*, sloj, stratum pyramidale

PV neuroni – interneuroni koji izražavaju paralbumin

PV/mm<sup>2</sup> – broj interneurona koji izražavaju paralbumin po milimetru kvadratnom (≅)

PVWMI – od engl. *periventricular white-matter injury*, ozljeda periventrikularne bijele tvari

Rad – od lat. *stratum radiatum*, sloj, stratum radiatum

RSC – od engl. *retrosplenial cingulate cortex*, retrosplenijalna moždana kora cingularne vijuge

SD – standardna devijacija

SEM – od engl. *standard error of mean*, standardna pogreška srednje vrijednosti

SLu – od lat. *stratum lucidum*, sloj, stratum lucidum

sO<sub>2</sub> – od engl. *O<sub>2</sub> saturation*, saturacija kisikom

SVZ – subventrikularna zona

SŽS – središnji živčani sustav

TCO<sub>2</sub> – od engl. *total CO<sub>2</sub>*, ukupan ugljikov dioksid

Wfa – od engl. *Wisteria floribunda agglutinin*, aglutinin japanske glicinije

Ž – ženke

# 1. UVOD

## 1.1. Perineuronske mreže

Perineuronske mreže (od engl. *perineuronal nets*, PNN) po prvi puta uočio je Camillo Golgi, 1890-ih te ih opisao kao „nježnu, retikularnu strukturu ... koja okružuje tijelo stanice neurona ... sve do drugog i trećeg reda arborizacije“ (1). Cajal je kasnije odbacio ove tvrdnje te je pogrešno smatrao da su strukture koje je Golgi prvotno opisao kao PNN-ove zapravo artefakti (2). Postojanje PNN-ova nije bilo potvrđeno sve do 1970-ih kada su postale dostupne moderne metode bojenja tkiva i označavanja specifičnih molekula (3). Međutim, sama struktura i funkcija PNN-ova ostala je većinom nepoznata neuroznanstvenicima sve do 2002. i suradnje Pizzorusa i Fawcetta (4).

PNN-ovi predstavljaju kondenziranu izvanstaničnu tvar mozga koja obavija tijela te proksimalne i srednje dendrite neurona, a često i početni segment aksona (5). Nalaze se prvenstveno oko brzo-okidajućih (engl. *fast-spiking*) interneurona koji sadrže parvalbumin, protein koji veže kalcij u mnogim područjima mozga (6). Ti interneuroni proizvode gama-aminomaslačnu kiselinu (engl. *gamma-aminobutyric acid*, GABA) koja je glavni inhibicijski neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu (SŽS) sisavaca te se stoga nazivaju i GABA-ergičkim neuronima. GABA se primarno sintetizira iz glutamata, kataliziranog glutamat dekarboksilazom (engl. *glutamic acid decarboxylase*, GAD), i prisutna je u 30 – 40 % sinapsi (7). Interneuroni i signalizacija GABA-e prepoznati su kao supstrat perinatalnih ozljeda koje su u osnovi mnogih neurorazvojnih poremećaja (8). PNN-ovi imaju modulirajuću ulogu u signalizaciji GABA-e i plastičnosti neurona nakon ozljede (5,9). Sinapse koje povezuju neurone okružene su i integrirane u PNN-ove (10).

GABA-ergički interneuroni čine 10 – 30 % kortikalnih neurona (11) te su zastupljeniji u ljudi nego u glodavaca. U glodavaca otprilike 40 % svih interneurona izražava protein parvalbumin (PV) (12). Utvrđeno je da su PV neuroni zahvaćeni u mnogim neurološkim i psihijatrijskim poremećajima razvojnog porijekla u ljudi i životinja (13–16). Sinaptička plastičnost ovisna o iskustvu u odrasloj dobi također se posebno oslanja na PNN-ove oko brzo-okidajućih PV neurona (17,18).

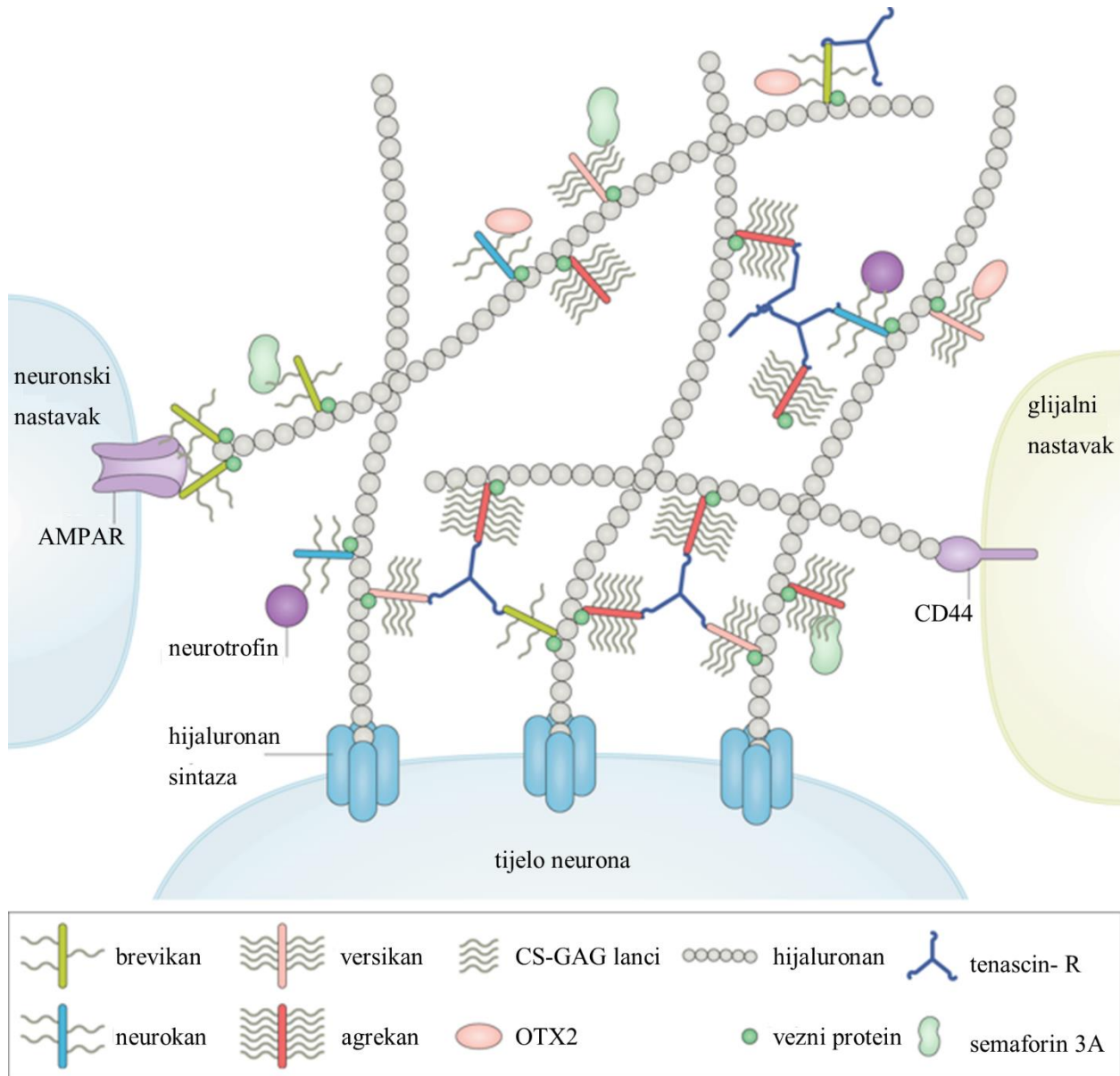
Ključna sastavnica PNN-ova koja je potrebna za njihovu strukturu i funkciju su lektikani, posebna porodica hondroitin sulfat proteoglikana (engl. *chondroitin sulfate proteoglycans*, CSPG) (5). Postoje četiri člana porodice lektikana: agrekan, brevikan, neurokan i versikan. Agrekan je



najzastupljeniji lektikan u hrskavici, versikan je izražen uglavnom u vezivnom tkivu, dok su neurokan i brevikan ograničeni na živčano tkivo. Sva četiri lektikana izražena su i u SŽS-u. Lektikani imaju važnu ulogu u razvoju neurona kao modulatori stanične adhezije, proliferacije i migracije (versikan) te u vođenju aksona i rastu neurita (neurokan) (19). Agrekan je najzastupljeniji predstavnik lektikana u svim PNN-ovima, dok su ostali poput neurokana, versikana i brevikana različito zastupljeni u različitim PNN-ovima (5,20–23).

Iako se PNN-ovi razlikuju po svom sastavu unutar i između područja mozga (5,21), opći strukturni principi vrijede za sve PNN-ove. PNN-ovi se sastoje od okosnice hijaluronana kojeg proizvodi enzim hijaluronan sintaza (prisutan u staničnoj membrani neurona oko kojih se nalaze PNN-ovi). Lektikani se pomoću veznog proteina (engl. *link proteins*) vežu na staničnu membranu neurona oko kojih se nalaze PNN-ovi (slika 1). Glikoprotein tenascin-R, koji se nalazi u izvanstaničnoj tvari (engl. *extracellular matrix*, ECM), povezuje lektikane jedne s drugima (5,19). Vezni proteini, uključujući vezni protein hijaluronana i proteoglikana 1 (engl. *hyaluronan and proteoglycan link protein 1*, HAPLN1) i vezni protein hijaluronana i proteoglikana 4 (engl. *hyaluronan and proteoglycan link protein 4*, HAPLN4), neophodni su za stabilizaciju CSPG-hijaluronan veze (slika 1) (5,24). Od lektikana poznato je da brevikan ima specifičnu ulogu u sinapsama i snažnoj interakciji s tenascinom-R i HAPLN4 (5,25–28). CSPG-i se sastoje od proteinske jezgre s kovalentno vezanim bočnim lancima glikozaminoglikana (engl. *glycosaminoglycan*, GAG). GAG lanci su veliki, nerazgranati polimeri sastavljeni od približno 20 – 200 ponavljajućih disaharidnih jedinica. Hondroitin sulfat-GAG (engl. *chondroitin sulfate*-GAG, CS-GAG) lanci sadrže naizmjenične jedinice N-acetil-galaktozamina i glukuronske kiseline. Najčešće su sulfatirane hidroksilne skupine na položaju 4 (CS-A) ili položaju 6 (CS-C) N-acetil-galaktozamina (5,29). Upravo dodavanje ovih sulfatnih skupina omogućuje CS-GAG lancima svojstva vezanja (5,30,31). Uz to, mnoge molekule uključujući neurotrofine, semaforin 3A i transkripcijski čimbenik OTX2, vežu se na CS-GAG lance, dopuštajući im da budu predstavljeni sinapsama i drugim procesima u okruženju SŽS-a te da se povežu s ionskim kanalima (slika 1). Aglutinin japanske glicinije (engl. *Wisteria floribunda agglutinin*, Wfa) veže se na sulfatni dio u CS-GAG lancima većine PNN-ova te se stoga naširoko koristi za prepoznavanje PNN-ova. Međutim, Wfa-negativni PNN-ovi nalaze se u moždanoj kori, leđnoj moždini i drugdje (5,32,33).

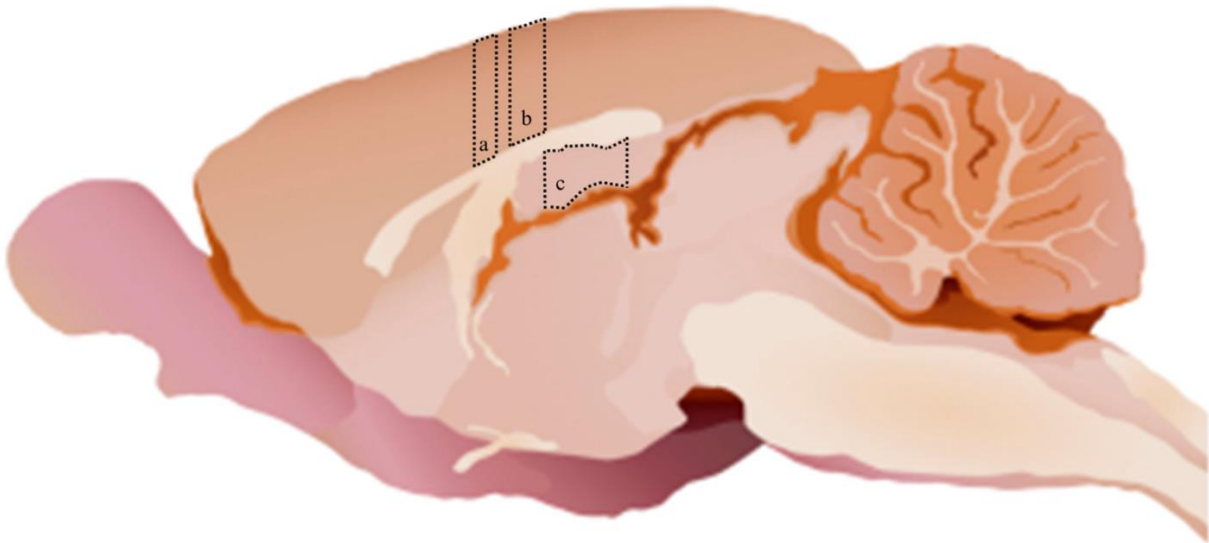
Osim PNN-ova smještenih oko tijela te proksimalnih i srednjih dendrita neurona postoje još tri oblika kondenziranog ECM-a u SŽS-u. Prvi oblik su PNN-ovi oko početnog segmenta aksona koji sadrže lektikane (agrekani, brevikani i neurokani), hijaluronan i tenascin-R (5,34,35). Sljedeći oblik jest perinodalni ECM koji se nalazi u ekstranodalnom prostoru i na Ranvierovim čvorovima u SŽS-u. Struktura mu je vrlo slična PNN-ovima s nekoliko iznimaka: perinodalni ECM stabiliziran je proteinom veze hijaluronana i proteoglikana 2 (od engl. *hyaluronan and proteoglycan link protein 2*, HAPLN2), a prevladavajući lektikani su brevikani, versikani i neurokani (5,36). Posljednji oblik kondenziranog ECM-a su omotači aksona koji sadrže agrekan i brevikan i okružuju inhibicijske presinaptičke završetke (5,37).



**Slika 1.** Shematski prikaz strukture i molekularnih sastavnica PNN-ova, izrađeno prema: Fawcett i sur. 2019. (5). Lektikani, porodica CSPG-a, ključna su sastavnica PNN-ova koja je potrebna za njihovu strukturu i funkciju od kojih je agrekan najzastupljeniji, dok su neurokan, versikan i brevikan različito zastupljeni u različitim PNN-ovima. GAG lanci vežu se na proteinski nukleus CSPG-a te uz pomoć semaforina 3A i transkripcijskog čimbenika OTX2 stvaraju sinapse. Wfa se veže na sulfatni dio u CS-GAG lancima većine PNN-ova te se stoga koristi kao metoda za prepoznavanje PNN-ova.

Mnogi autori opisuju PNN-ove kao polianionski, mrežasti omotač neurona (6,38). PNN-ovi su vrlo dinamična struktura s važnom ulogom u sinapsama (39), plastičnosti (40,41), učenju (42,43), pamćenju (44,45), ponašanju i stanjima kao što su autizam, epilepsija i shizofrenija (45,46). Sve je veći interes za PNN-ove budući da je riječ o modulatorima staničnog integriteta i plastičnosti neurona, kako u zdravlju tako i u bolesti. Nekoliko pretkliničkih studija analiziralo je PNN-ove nakon perinatalne hipoksijske ozljede mozga (47–49). Međutim, cjeloživotni učinci perinatalne hipoksije, a posebno njeni blagi do umjereni učinci, na razvoj PNN-ova oko interneurona i posljedičnu funkciju mozga, nisu istraženi. Naime, otkrivanje molekularnih i staničnih uzročno-posljedičnih veza, vremenskih točaka najveće ranjivosti i njihovog odnosa s neurološkim i kognitivnim ishodom, moglo bi značajno poboljšati razumijevanje perinatalne hipoksije i olakšati potragu za potencijalnim terapijskim ciljevima.

U ovom istraživanju proučen je izražaj PNN-ova u mozgu štakora nakon kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije kako bi se utvrdio njihov vremenski i prostorni razmještaj, odnosno kolokalizacija PNN-ova uz subpopulacije interneurona i piramidnih kortikalnih neurona te njihov razmještaj u područjima i poljima. Područja od interesa su moždana kora cingularne vijuge (engl. *cingulate cortex*, CG) (46) i hipokampus (50) (slika 2). CG je u štakora podijeljen u tri polja: prednja moždana kora cingularne vijuge (engl. *anterior cingulate cortex*, ACC), srednja moždana kora cingularne vijuge (engl. *midcingulate cortex*, MCC) i retrosplenijalna moždana kora cingularne vijuge (engl. *retrosplenial cingulate cortex*, RSC) (slika 2). MCC, kao zasebno polje CG-a u štakora, definiran je 2004. godine (51), a detaljno opisan 2014. godine (52) te se smatra da se njegova uloga ostvaruje kroz interakciju s druga dva polja CG-a – ACC-om i RSC-om (46), u relevantnom učenju odabirom različitih strategija učenja te u donošenju odluka (53). Također, smatra se da ima ulogu i u emocionalnom učenju (54). RSC je uključen u prostornu navigaciju te pamćenje i učenje pomoću vizualnih znakova za navigaciju kroz prostor (52–54). Hipokampus ima glavnu ulogu u učenju i pamćenju te su nazubljena vijuga (lat. *gyrus dentatus*, GD) i polja Amonovog roga (lat. *Cornu Amonis*, CA): polje Amonovog roga 1 hipokampusa (engl. *field CA1 of the hippocampus*, CA1), polje Amonovog roga 2 hipokampusa (engl. *field CA2 of the hippocampus*, CA2) i polje Amonovog roga 3 hipokampusa (engl. *field CA3 of the hippocampus*, CA3) područja i polja od interesa za ovo istraživanje (50,55,56).



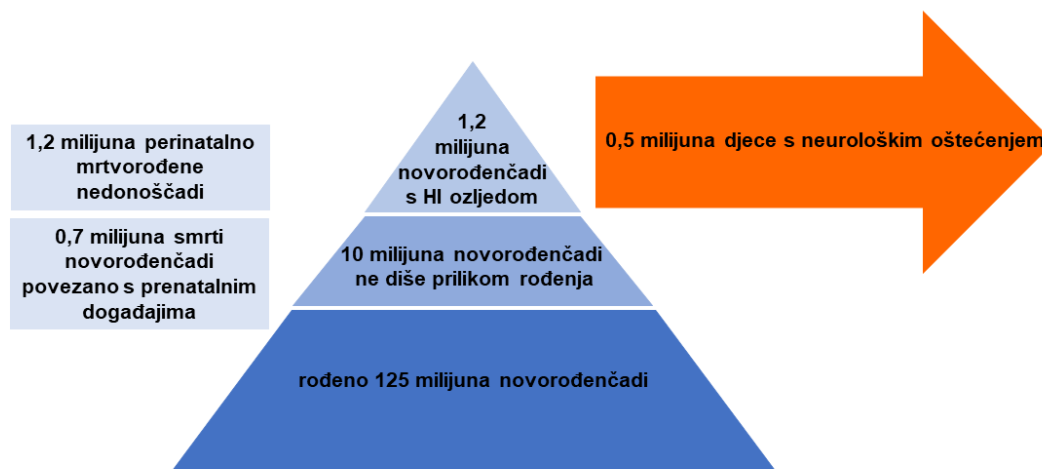
**Slika 2.** Shematski prikaz sagitalnog presjeka mozga odraslog štakora. Isprekidanim linijama označena su područja i polja od interesa u ovom istraživanju. a) označava polje srednje moždane kore cingularne vijuge; b) označava polje retrosplenijalne moždane kore cingularne vijuge; c) označava područje hipokampusa. Shematski prikaz izrađen je prema grafičkom dizajnu dostupnom na poveznici <https://neuroscience-graphicdesign.com/2017/08/01/post-1-rat-brain-gallery/>.

## 1.2. Perinatalna hipoksijsko-ishemijska ozljeda mozga

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organisation*, WHO) prijevremeno rođena djeca (nedonošćad) definiraju se kao djeca živorođena prije navršenih 37 tjedana gestacije. Potkategorije prijevremenog rođenja na temelju gestacijske dobi su: izrazito prerano (manje od 28 tjedana), vrlo prerano (28 do 32 tjedna) i umjereno do kasno prijevremeno rođenje (32 do 37 tjedana). Diljem svijeta 11,1 % sve živorođene djece na godišnjoj razini je prijevremeno rođeno, a zbog napretka perinatalne medicine taj postotak je u porastu. Osim toga, u razvijenim je zemljama napredak u neonatalnoj skrbi rezultirao i povećanjem stope preživljavanja u nedonošćadi. Međutim, prijevremeno rođena djeca i dalje imaju povećani rizik od nastanka poremećaja koji uključuju sindrom respiratornog distresa, bronhopulmonalnu displaziju, retinopatiju nedonošćadi, poteškoće s hranjenjem, nekrotizirajući enterokolitis, infekcije, dužu hospitalizaciju i nepovoljni

dugoročni ishod. U slabije razvijenim zemljama prijevremeno rođenje vodeći je uzrok smrtnosti novorođenčadi i dojenčadi. Kod prerano rođene djece, a osobito u vrlo prerano rođene (< 32 tjedna gestacije), visoka je učestalost neonatalne ozljede mozga s nepovoljnim učincima na motoričke, kognitivne, bihevioralne, socijalne i senzoričke sposobnosti. Osim tjedana gestacije, važan prognostički čimbenik je i težina nedonoščadi. Učestalost nepovoljnih neurorazvojnih ishoda varira u nedonoščadi s nižom porođajnom težinom (< 1000 g): 17 % prijevremeno rođene djece ima velika oštećenja dok 42 % ima manja oštećenja. Što je niža gestacijska dob pri rođenju, to je učestalost cerebralne paralize i drugih nepovoljnih neurorazvojnih poremećaja veća (5 – 10 % u nedonoščadi s malom porođajnom težinom < 1500 g; 6 – 20 % u izrazito prijevremeno rođene djece < 26 tjedana gestacije; 25 % u djece rođene prije 25. tjedna gestacije) (57).

Perinatalna hipoksijsko-ishemijska (HI) ozljeda mozga i prijevremeni porod najčešći su uzroci neuroloških poremećaja ili poremećene funkcije mozga razvojnog porijekla (58–62). Trećina novorođenčadi s HI ozljedom mozga umire, a 20 – 40 % preživjelih razvija neki oblik neurološkog oštećenja, uključujući cerebralnu paralizu, epilepsiju, kognitivna oštećenja te nedostatke u obrascima ponašanja u djetinjstvu ili kasnijoj dobi (slika 3) (63–67).



**Slika 3.** Prikaz kliničkog učinka perinatalne HI ozljede mozga, izrađeno prema: Millar i sur. 2017. (61). Brojčani prikaz novorođenčadi oboljele od neonatalne HI ozljede mozga u odnosu na broj živorođene djece na godišnjoj razini diljem svijeta.

Između 24. i 40. tjedna gestacije ljudski mozak prolazi kroz bitne diferencijacijske promjene. Ključni razvojni procesi tijekom tog perioda uključuju razvoj bijele tvari (premielinizirajuće

oligodendrocite, aksone, mikrogliju i neurone (neuroni pod kortikalnom pločom i kasni migrirajući GABA-ergički neuroni)), proliferacijskih zona (dorzalna subventrikularna zona telencefalona i ventralni germinativni epitel ganglijskog brežuljka) i razvoj neuronskih struktura (talamusa, moždane kore i bazalnih ganglija). Ovi razvojni događaji čine razdoblje od 24. do 40. tjedna gestacije posebno osjetljivim na HI ozljedu, upalu i toksična oštećenja (57). Mozak nedonoščeta osjetljiv je na ozljede zbog nezrelosti krvno-moždane barijere, nepotpune mijelinizacije, nedostatka sposobnosti za proizvodnju protuupalnih citokina kao i nedostatka endogenih trofičkih čimbenika poput alopregnanolona (68).

Faze stanične smrti i biokemijske interakcije na staničnoj razini u HI ozljedi mozga do danas su dobro proučene i opisane. Postoje 3 faze tijekom HI ozljede mozga: 1) primarni nedostatak energije gdje nedostatak kisika sprječava oksidativnu fosforilaciju i dolazi do poremećene aktivnosti Na–K pumpe koja je praćena anaerobnim metabolizmom s nakupljanjem mliječne kiseline; 2) ekscitacijska faza koja se odnosi na staničnu smrt koja je posredovana pretjeranom stimulacijom receptora ekscitatorne aminokiseline kao odgovor na glutamat dikarboksilne kiseline te se na staničnoj razini vjeruje da je temeljna za HI oštećenje neurona; 3) sekundarna faza nedostatka energije koja počinje 6 – 48 sati nakon inicijalnog inzulta, a dovodi do stanične smrti kroz apoptozu ili nekrozu, ovisno o zahvaćenom području mozga i jačini ozljede (kod teških ozljeda dominira nekroza dok se apoptoza uočava kod blažih inzulta) (57).

Utjecaj HI ozljede na mozak u razvitku uvjetovan je jačinom i intenzitetom ozljede, vremenskom razdoblju u kojem je nastala asfiksija, selektivnoj staničnoj ranjivosti i nezrelosti mozga. Tanke, osjetljive žile mozga u razvoju nisu u mogućnosti dostatno održavati učinkovit protok krvi kako bi kompenzirale HI ozljedu zbog nerazvijene distalne arterijske mreže i nezrelog moždanog autoregulacijskog kapaciteta. Periferne arterije u rastućem mozgu nemaju kolateralne žile i imaju ograničenu vazodilatacijsku funkciju kao odgovor na HI ozljedu što ih čini osjetljivijima na hipoksijsku ozljedu. HI ozljeda rezultira promijenjenom funkcijom i povećanom propusnošću krvno-moždane barijere. Hipoksijski inzult utječe na važne stanične i funkcionalne komponente krvno-moždane barijere, astrocite i uske spojeve endotelnih stanica i pericita (57).

Astrociti su dominantna stanična populacija u SŽS-u. Oni pružaju strukturnu i metaboličku potporu, imaju presudnu ulogu u čišćenju visokih razina ekscitacijskih neurotransmitera i važan su

sastojak krvno-moždane barijere. Kao odgovor na HI ozljedu astrociti utječu na preživljavanje neurona te imaju neurozaštitnu ulogu nakon ozljede potičući eritropoezu. Međutim, trajna HI ozljeda može dovesti do smanjene funkcije populacije astrocita i time uvelike smanjiti mogućnost regeneracije neurona. Progenitori premijelinizirajućih i zrelih oligodendrocita vrlo su osjetljivi na hipoksijsku ozljedu, a ta je ranjivost središnja u patogenezi ozljede bijele tvari i periventrikularnoj leukomalaciji u prijevremeno rođene djece (57).

U mozgu prilikom njegova razvitka određene regije i stanice ranjivije su na ozljedu ovisno o vremenu nastanka i njenoj težini. U mozgu prijevremeno rođene djece neuroni pod kortikalnom pločom i prekursori oligodendrocita najranjiviji su na ishemijsku ozljedu, dok u mozgu djece rođene u terminu posebno su projekcijski neuroni u dubokoj sivoj jezgri u najvećem riziku tijekom ishemijskih inzulta. Neuroni pod kortikalnom pločom su najranije i najprolaznije populacije stanica neokorteksa i zahvaćeni su HI ozljedom (57).

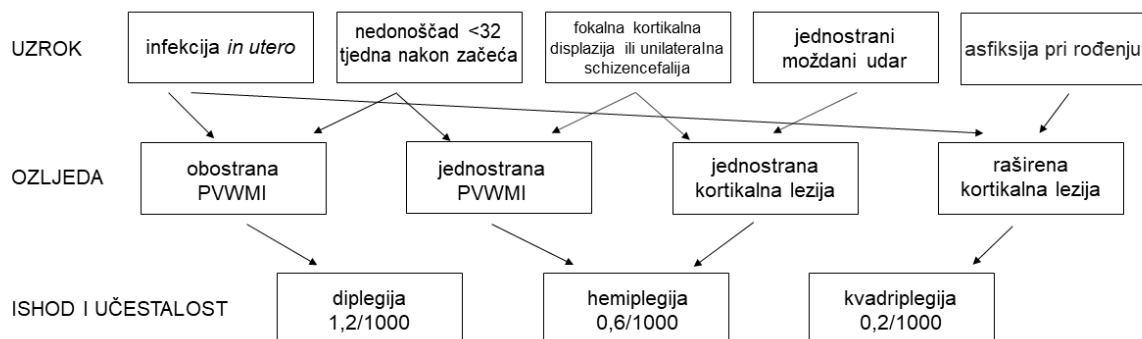
Magnetska rezonancija (engl. *magnetic resonance imaging*, MRI) smatra se najosjetljivijom radiološkom metodom snimanja za mnoga patološka stanja mozga novorođenčeta. Tehnike kao što su magnetna spektroskopija (engl. *magnetic resonance spectroscopy*, MRS) i difuzijska traktografska metoda snimanja (engl. *diffusion tensor imaging*, DTI) pomažu u procjeni stupnja razvoja mozga novorođenčadi. MRS snimanje mjeri regionalne biokemijske promjene mozga i korisno je u procjeni metaboličkih promjena povezanih s razvojem mozga i ozljedama mozga. Vrlo je malo dobro osmišljenih studija koje mogu odgovoriti na pitanja mogućih neuroloških ishoda nakon HI ozljede u prijevremeno rođene djece (57,69).

Postoji mnogo uzročnika i čimbenika koji doprinose nastajanju cerebralne paralize, kao što su ozljeda periventrikularne bijele tvari (engl. *periventricular white-matter injury*, PVWMI) u nedonoščadi i perinatalni infarkti srednje moždane arterije ili generalizirana anoksija u djece rođene u razdoblju termina. Vjeruje se da ti višestruki uzroci koji uključuju i intrauterinu infekciju ili genetsku podložnost za infarkt djeluju sinergijski kako bi izazvali klinički značajnu ozljedu (70). PVWMI često se viđa u nedonoščadi i novorođenčadi s malom porođajnom težinom (70) i najvažniji je uzrok cerebralne paralize u nedonoščadi. Unatoč multifaktorskoj etiologiji (genetska, trofička, infektivna, upalna, *ante-* ili postnatalna), najčešće pronađena PVWMI posljedica je HI ozljede reperfuzijskog nedostatka u periventrikularnim regijama oko lateralnih komora (slika 4)



(61,70–73). U njoj dolazi do oštećenja sloja pod kortikalnom pločom (engl. *subplate zone*) i razvoja subkortikalnih aksonskih puteva srednje zone dok je siva tvar moždane kore relativno pošteđena. Takva ozljeda mozga uzrokuje spastičnu diplegiju koja može biti obostrana (prevalencija 1,2 na 1000 živorođene djece) i jednostrana (prevalencija 0,6 na 1000 živorođene djece). Otprilike jedna trećina slučajeva proizlazi iz žarišne PVWMI, a jedna trećina slučajeva uključuje ozljedu kortikalne ili duboke sive tvari uglavnom kao rezultat infarkta srednje moždane arterije. Daljnja trećina takvih slučajeva posljedica je nerazvijenosti mozga, uglavnom zbog fokalne kortikalne displazije ili unilateralne shizencefalije. Teža hipoksija ili anoksija u vrijeme rođenja povezana je s raširenom ozljedom bijele i sive tvari koja rezultira spastičnom kvadriparezom uz teške kognitivne deficite (slika 4) (70).

Najveća osjetljivost ljudskog mozga na HI ozljedu je između 23. i 32. tjedna nakon začeća, odnosno u fazi intenzivne stanične migracije, proliferacije glija stanica, navođenja aksona, sinaptogeneze te diferencijacije dendrita. Osim periventrikularnih područja posebno su ugrožena i područja križanja rastućih aksonskih puteva (engl. *axonal crossroads*) i sloj pod kortikalnom pločom koje obilježava obilje difuznog ECM-a (74–84). Hipoksija dovodi do povećanja moždanog protoka krvi što može rezultirati trajnim i/ili reverzibilnim promjenama neuronskih funkcija ovisno o njezinoj težini (85).



**Slika 4.** Shematski prikaz višestrukih uzroka koji u kombinaciji dovode do cerebralne paralize, izrađeno prema: Clowry i sur. 2014. (70). Prikaz najčešćih uzroka, ozljeda moždanog tkiva te ishoda spastične cerebralne paralize.

Umjereni hipoksijski događaji u fetusa tijekom srednjeg razdoblja gestacije često ostaju nezapaženi. Međutim, takvi događaji mogu izazvati posljedične procese koji dovode do zdravstvenih problema u ranjivih i predisponiranih pojedinaca, završavajući prekidom gestacije ili

ranim ili kasnim prijevremenim rođenjem djece. Kod manje osjetljivih pojedinaca mogu dovesti do dugotrajnih promjena u strukturi mozga ili ponašanju.

Otprilike 50 – 60 % djece rođene ekstremno prijevremeno će razviti kognitivna oštećenja i poremećaje u ponašanju. Blaga perinatalna HI ozljeda očituje se metaboličkom acidozom, abnormalnim otkucajima srca tijekom porođaja i kasnije niskim ocjenama Apgar testa. U prijevremeno rođene djece blaga HI ozljeda definirana modificiranim Sarnatovim kriterijima povezana je s normalnim neurološkim nalazom kod otpusta unatoč tome što su abnormalnosti bijele tvari vidljive na MRI-u (69,86).

Funkcionalni dokazi pokazuju da su rani i kasni prijevremeni porodi povezani sa smanjenom kortikalnom plastičnošću u adolescenciji. Neinvazivna transkranijalna magnetska stimulacija mozga pokazuje smanjen dugoročan odgovor nalik na depresiju, što govori u prilog tome da smanjena među- i/ili unutar-regionalna povezanost smanjuje neuroplastični kapacitet. Ovi podaci pokazuju da je oslabljena neuralna povezanost snažno povezana s HI ozljedom i perinatalnom upalom te je glavni uzrok neurorazvojnih poremećaja nakon prijevremenog poroda. Budući da mikroglija i astrociti luče proupalne citokine tijekom razvoja neuralne ozljede, a sama HI ozljeda neprestano izaziva intenzivnu upalnu reakciju s perifernom upalom i lokalnom indukcijom mikroglije (69,86), lako je zaključiti kako ključnu ulogu kronične ili sekundarne povećane regulacije glije i citokina u patogenezi ozljede mozga u prijevremeno rođene djece imaju upravo mikroglija i astrociti. Zbog svega navedenoga, važno je zaključiti i naglasiti da blage perinatalne HI ozljede mogu izazvati progresivnu evoluciju ozljede mozga.

### **1.3. Animalni modeli HI ozljede mozga**

Eksperimentalni animalni modeli važni su za shvaćanje patogeneze i mogućnosti liječenja perinatalne HI ozljede mozga (87). Laboratorijski štakor najzastupljenija je životinjska vrsta u istraživanju perinatalne HI ozljede mozga i proučavanju njezinih kratkoročnih i dugoročnih učinaka na različite aspekte razvoja i karakteristika mozga (61,88) zbog sljedećih činjenica: a) temeljitog poznavanja anatomije i fiziologije štakora; b) štakori su značajno veći od miševa (250 – 350 g) i c) suradljiviji, što omogućava lakšu eksperimentalnu manipulaciju i pouzdaniji ishod testiranja ponašanja; d) veličina štakorskog mozga daje bolju prostornu i vremensku rezoluciju od

mišjeg mozga; e) štakori su razvijeniji u smislu učenja i pamćenja, mogu naučiti širi spektar zadataka važnih za istraživanja spoznajnih sposobnosti; f) postoji mogućnost kvalitetnije usporedbe tijekom fetalnog i perinatalnog razvitka s ljudskim mozgom fetalne i rane postnatalne dobi (69,87,89,90).

Model perinatalne ozljede mozga u štakora, koji bi po svom načinu nastanka i intenzitetu oponašao fetalne ozljede mozga čovjeka početkom druge polovice gestacije, jest onaj koji uključuje HI ozljedu prvog postnatalnog dana (P1) (69,87,89–91). Vremenski okvir P1 – P3 približno je istovjetan razdoblju od 23. do 32. tjedna gestacije i razvoju ljudskog mozga na temelju određenih morfogenetskih procesa, kao što su proliferacija, migracija i vaskulogeneza. To je period u kojemu se događaju značajniji razvojni procesi u štakorskom mozgu koji odgovaraju usporedivim razvojnim procesima u ljudskom SŽS-u, kao što su sazrijevanje oligodendrocita, razvoj imunološkog sustava, uspostavljanje krvno-moždane barijere, i sl. (69,87,89–91).

Za istraživanje promjena mozga tijekom HI ozljede kao i za testiranje novih terapija razvijeni su različiti animalni modeli. Korištenje ovih modela omogućuje kontroliranje višestrukih čimbenika koji mogu utjecati na ozbiljnost HI ozljede, uključujući razvojnu zrelost u vrijeme ozljede, trajanje i jačinu hipoksije, mjesto ozljede unutar mozga i pojedinačne naspram ponavljajućih HI ozljeda. Sposobnost mijenjanja ovih čimbenika unutar animalnih modela pokazala je kako oni utječu na neonatalni mozak i kako se on oporavlja nakon HI ozljede (69).

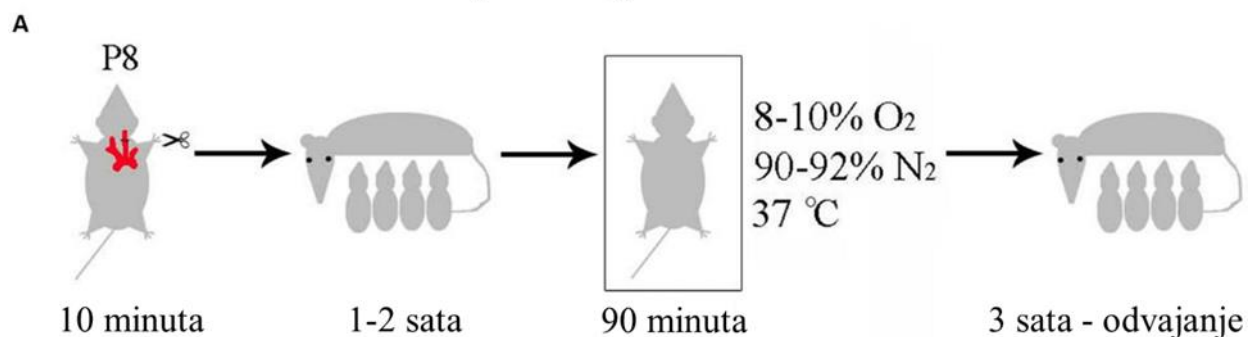
Postoje mnogi animalni modeli umjerene do teške HI ozljede mozga na velikim i malim laboratorijskim životinjama koji najčešće oponašaju HI ozljedu mozga u djece rođene u terminu. Neonatalna HI ozljeda opsežno je istraživana na laboratorijskim miševima i štakorima dok manji broj istraživača također proučava HI ozljedu koristeći veće laboratorijske životinje kao što su svinje, ovce i makaki majmuni (61,92). Već 40 godina “zlatni standard” animalnih modela u izvođenju HI ozljede mozga jest Rice-Vannuccijev model (slika 5) (93) koji uključuje jednostrano podvezivanje karotidne arterije, nakon čega slijedi izlaganje štakora P7 hipoksijskim uvjetima (8 % O<sub>2</sub> tijekom 1 – 3 sata na 37 °C) (93,94). Postoje mnoge varijacije ovog modela koje uključuju okluziju zajedničke karotidne arterije (engl. *common carotid artery occlusion*, CCAO) koja može biti jednostrana i obostrana te okluziju srednje moždane arterije (engl. *middle cerebral artery occlusion*, MCAO). Životinje se tada izlažu hipoksijskim uvjetima od 6,5 do 10 % kisika (najčešće

8 %) u razdoblju od 10 minuta do 3,5 sata, ovisno o vrsti, soju i dobi životinje (61,69). Premda se originalno koristi na laboratorijskim štakorima, ovaj model uspješno je prilagođen i za laboratorijske miševe. U većini studija HI ozljeda izazvana je u dobi P7, dok manji broj studija koristi fetalne životinje i to najčešće dobi P3 i P5. Miševi s HI ozljedom u dobi P3 pokazali su ipsilateralnu ventrikulomegaliju nakon jednostranog CCAO-a zajedno s atrofijom mozga i ozljedom somatosenzoričke moždane kore, strijatuma i hipokampusa što je bilo vidljivo nakon MRI snimanja i naknadne patološke analize 10 tjedana nakon inzulta. Sličnosti s nedonoščadi očituju se u zahvaćenosti kortikalne bijele tvari. Međutim, ovi nalazi razlikuju se od onih u prijevremeno rođene djece gdje se ozljeda ne pokazuje često u strijatumu, bazalnim ganglijima ili hipokampusu u vrlo ranoj nedonoščadi (61,69). Miševi s HI ozljedom u dobi P5 nakon obostranog CCAO-a imaju vidljiva oštećenja uglavnom u unutarnjoj moždanoj čahuri (lat. *capsula interna*) i rijetko vidljiva oštećenja moždane kore koja su vizualizirana samo patološkom analizom. Uključenost unutarnje moždane čahure pojavljuje se sekundarno u kasne nedonoščadi gdje područja bazalnih ganglija postaju metabolički aktivnija kako se novorođenče približava terminu poroda (61,69). Štakori i miševi koji su bili podvrgnuti HI ozljedi u dobi P7 pokazali su višestruka oštećena područja nakon jednostranog ili obostranog CCAO-a. Područja koja su oštećena uključuju bijelu tvar, periventrikularnu bijelu tvar, bazalne ganglije, žuljevito tijelo (od lat. *corpus callosum*, CC), moždanu koru, strijatam, hipokampus i talamus. Kontrolna slika također je pokazala atrofiju mozga. Oštećenje moždane kore u P7 miševa počinje se bolje poklapati s područjima zahvaćenim u kasne nedonoščadi te ta proporcionalnost raste kako se približava 36. tjedan gestacije (61,69). Obostrani CCAO smatra se jačim modelom jer rezultira oštećenjem bijele tvari, acidozom mozga, smanjenim moždanim protokom krvi, smanjenim moždanim unosom glukoze, a također je dokazan i upalni odgovor (61). Prijevremeno rođena djeca i istovjetni animalni modeli trebali bi pokazivati znakove atrofije mozga pri dugotrajnom praćenju nakon HI ozljede. Jasna replikacija HI ozljede u nedonoščadi na mišjim modelima izvedena je s različitim stupnjevima uspjeha. Naime, uključenost bazalnih ganglija dosljedno je prikazana od fetalne dobi do P7 mišjih modela koji su usporedivi s ozljedom viđenom u kasne nedonoščadi, ali nisu u skladu s relativnom poštedom bazalnih ganglija koja je vidljiva kod vrlo prijevremeno rođene nedonoščadi. Ozljeda bijele tvari, CC-a i CG-a viđena u mišjem modelu može se očekivati u nedonoščadi. Također, ozljeda hipokampusa koja je vidljiva u mišjim modelima nije očekivana u prijevremeno rođene djece čega bi istraživači trebali biti

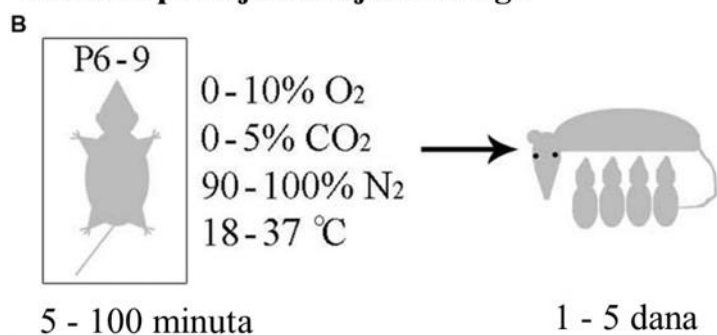
svjesni prilikom usporedbe ovih podataka na nedonoščad. Čini se da je štakorski postnatalni model P7 najbolji model za predstavljanje sveukupnog oštećenja vidljivog u kasne nedonoščadi gdje ozljeda često zahvaća bijelu tvar, bazalne ganglije i talamus, a dijelom i zbog toga što je najbolje proučen (69).

Neki istraživači izazivaju isključivo hipoksijsku ozljedu kod glodavaca korištenjem komore s niskom koncentracijom kisika bez prethodnog ishemijskog postupka. Ovi modeli nisu tako široko korišteni kao Rice-Vannuccijeva metoda, ali imaju potencijal za opisivanje blaže ozljede uz izostanak nefiziološke okluzije zajedničke karotidne arterije. U takvim modelima najčešće se koristi laboratorijski štakor dobi P6 do P9. Mladunci štakora stavljaju se u komoru u kojoj je smjesa plinova kisika, dušika i/ili ugljikovog dioksida u različitim koncentracijama ovisno o modelu i dobi životinje (0 – 10 % kisika, 0 – 5 % ugljikovog dioksida, 90 – 100 % dušika) tijekom 50 – 100 minuta (slika 5) (61,95). Nakon toga u nekim studijama mladunci su odmah vraćeni u uvjete atmosferskog zraka, dok su u nekim drugim studijama mladunci podvrgnuti postupnoj smanjenoj koncentraciji ugljikovog dioksida. Kod mladunaca koji su bili podvrgnuti samo hipoksiji te kasnije smanjenoj koncentraciji ugljikovog dioksida zabilježena je veća stopa smrtnosti i veća učestalost napadaja. Testiranje ponašanja u nekim studijama pokazalo je promjenu fenotipa ponašanja uključujući hiperaktivnost, povećanu agresivnost, promijenjenu ultrazvučnu vokalizaciju i poremećaje u spavanju. Važno je napomenuti da je u relativno malo studija provedeno testiranje ponašanja koristeći standardne testove prostornog pamćenja i lokomotornog ponašanja (61). Također, zabilježene su i studije samo hipoksijske ozljede u štakora različite embrionalne dobi (E13,5 – E17) gdje se gravidne ženke stavljaju u hipoksijsku komoru smjese plinova (kisika, dušika i/ili ugljikovog dioksida) različitih koncentracija. U tih životinja vidljive su promjene u strukturi živčanog tkiva u somatosenzoričkoj moždanoj kori koje koreliraju s poremećajima u ponašanju. Te su promjene djelomično s vremenom kompenzirane, iako su odrasle životinje podvrgnute akutnoj prenatalnoj hipoksiji bile manje sposobne naučiti i svladati nove složene zadatke (95). Hipoksija se također može izvoditi u komori s hipobaričnim uvjetima koji modeliraju visinsku hipoksiju ili izlaganjem gravidnih ženki kroničnim blagim koncentracijama ugljikovog monoksida. Mogući su i kemijski pristupi izazivanja hipoksije, npr. davanje natrijevog ili dušikovog oksida, kao i kirurški zahvati koji ograničavaju dotok krvi u fetuse npr. začepljenja pupkovine ili jednostrano podvezivanje maternične arterije (lat. *arteria uterina*) (95).

## Rice - Vannucci model HI ozljede mozga



## Model hipoksijske ozljede mozga



**Slika 5.** Prikaz odabranih korištenih modela neonatalne HI ozljede mozga na štakoru, izrađeno prema: Millar i sur. 2017 (61). A) Shematski prikaz Rice-Vannuccijeve metode i njene modifikacije. (B) Shematski prikaz modela koji uključuju samo hipoksijsku ozljedu.

Postoje i alternativni modeli izazivanja HI ozljede, kao što je primjerice neonatalna HI ozljeda u majmuna o kojima postoji relativno malo studija. Na makaki majmunima najčešće se koristi okluzija pupčane vrpce (engl. *umbilical cord occlusion*, UCO) kao metoda izazivanja HI ozljede. Dob makakija korištenih za HI ozljedu bila je između 164 do 173 dana gestacije, a puna gestacija iznosi 173 dana. Razvoj mozga životinja na ovoj razini zrelosti usporediv je s kasnom nedonoščadi. Međutim, MRI studije uglavnom nisu pokazale značajne razlike između eksperimentalnog i kontrolnog modela ili pri dugotrajnom ponovljenom snimanju. Difuzijski mjerene snimke (engl. *diffusion weighted imaging*, DWI) pokazale su normalnu molekularnu aktivnost i staničnu funkciju za sve životinje i nije bilo dokazanih promjena u ukupnom volumenu mozga, ishemijskih promjena ili formiranju cista u blizini rođenja ili dva mjeseca nakon ozljede. MRS unutar prvih 8 dana života pokazao je povećan kolin i laktat, povišen mioinozitol, smanjen *N*-acetyl<sub>s</sub>partat (NAA) i smanjen

omjer NAA/kreatin. Nečovjekoliki majmuni najbliži su model za oponašanje HI ozljede u novorođenčadi zbog svojih fizioloških i anatomske sličnosti. Prednosti modela uključuju slična područja ozljeda unutar jezgri talamusa kao i dosljedne abnormalnosti na MRS-u. Međutim, nedostatak značajne ozljede pri dugotrajnom praćenju nije u skladu s ozljedom mozga u prijevremeno rođene djece (61,69).

Modeli HI ozljede u ovaca koja je izazvana koristeći bilateralnu CCAO u gestacijskoj dobi između 88. i 97. dana (što je približno ekvivalentno nedonoščadi od 24 do 28 tjedana) pokazuju nekrozu subkortikalne bijele tvari, gubitak neurona u talamusu i strijatumu, PVWMI, a MRI snimanje pokazalo je nepravilnost moždane hemisfere ili gubitak kortikalne vrpce (tanak sloj sive tvari oko hemisfera velikog mozga) i nejasan kortikalni signal. Ova istraživanja prikazuju oštećenja u područjima koja su u velikoj mjeri u skladu s ozljedom uočenom u nedonoščadi nakon HI ozljede, dok se ozljeda sive tvari u moždanoj kori ne bi očekivala kod prijevremeno rođene djece (69,91). Također, u ovaca kod kojih se koristila UCO metoda za izazivanje HI ozljede mozga prikazan je gubitak neurona u hipokampusu (61,69).

Kunići su također korišteni kao model neonatalne HI ozljede, s ozljedom izazvanom od 21. do 29. dana gestacije. Fetalni kunići u gestacijskoj dobi od 22 dana jednaki su gestacijskoj dobi čovjeka od 22 do 27 tjedana. Ozljeda je prvenstveno prikazana u bijeloj tvari uključujući CC, unutarnju moždanu čahuru i prednju komisuru. Prijevremeno rođeni fetusi kunića izloženi dugotrajnoj HI ozljedi pomoću UCO pokazuju značajne promjene u motoričkim odgovorima na olfaktorne podražaje, koordinaciju sisanja i gutanja te značajnu hipertoniju koja podsjeća na spastičnu kvadriplegiju. DWI snimanje otkrilo je gubitak bijele tvari zbog kojeg su svi kunići razvili hipertoniju. Značajno je da je samo kod klinički hipertoničnih kunića otkrivena ozljeda bijele tvari na MRI-u. Crvena jezgra srednjeg mozga bila je jedina struktura sive tvari oštećena na MRI snimanju. Nedostatak ozljede jezgri bazalnih ganglija u ovim modelima blisko je povezan s nalazom u prijevremeno rođene djece nakon HI ozljede. Može se očekivati da će novorođenčad u ovoj izrazito preuranjenoj dobi doživjeti oštećenje moždanog debla koje može uključivati crvenu jezgru srednjeg mozga viđenu u modelu kunića. Osim toga, ozljeda CC-a i prednje komisure može se očekivati u nedonoščadi (61,69). Još jedan model koji obećava je model na bodljikavom mišu (engl. *spiny mouse*), glodavcu koji pokazuje sličnu razinu razvoja mozga ljudskog novorođenčeta

pri rođenju, koji također pokazuje raznolike motoričke deficite i neuroanatomske patologije nakon neonatalne HI ozljede (61).

Također, vrlo je malo studija koje proučavaju spolne razlike nakon HI ozljede. Važno je napomenuti da je u muške novorođenčadi male porođajne težine učestalost intraventrikularnog krvarenja značajno veća, kao i učestalost spastične cerebralne paralize (u usporedbi s djevojčicama (za 20 – 30 %). Štoviše, oporavak volumena mozga manji je kod dječaka nego kod djevojčica jer muško nedonošče s malom porođajnom težinom i dalje ima vidljive deficite bijele tvari u dobi od 8 godina, dok djevojčice iste težine nemaju. U modelu glodavaca promatrane su spolne razlike u okviru patofizioloških mehanizama koji leže u osnovi evolucije i oporavka oštećenja mozga. U ženki je zabilježena apoptoza ovisna o kaspazi, dok je kod mužjaka stanična smrt i naknadno oštećenje mozga povezano s drugačijim putem nastanka koji uključuje aktivaciju proteina poli (ADP-riboza) polimeraza (engl. *poly (ADP-ribose) polymerase*, PARP). Unatoč različitim spolnim fiziološkim procesima u odgovoru na ozljedu, konačan opseg oštećenja mozga nakon HI ozljede u dobi P7 ili prije puberteta bio je sličan u mužjaka i ženki. Međutim, te studije provedene su u periodu kada se razvoj mozga glodavaca grubo razvija i odgovara djeci rođenoj u terminu. Akutna HI ozljeda u dobi P3 ili kronična HI ozljeda između P3 i P11 izazvala je značajno veća oštećenja bijele i sive tvari, veće smanjenje volumena mozga i veći kognitivni deficit kod mužjaka u odnosu na ženke što je u korelaciji s oštećenjima koja su vidljiva kod nedonoščadi. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razjasnili spolno specifični mehanizmi nastanka odgovora na HI ozljedu (96).

Unatoč mnogim studijama kojima se istražuju učinci HI ozljede na spoznajne sposobnosti pomoću Rice-Vannuccijeva modela i njegovih varijacija (61), vrlo je malo istraživanja proučavalo dugoročne učinke HI ozljede mozga histološkim metodama, a još manje promjene u molekularnim biljezima (apoptoza, gliozna ili mijelinizacija). Testiranje ponašanja još je rjeđe analizirano u relevantnim istraživanjima (70,97–99). Također, istraživanja koja uključuju utjecaj hipoksije na oba spola tijekom dužeg vremenskog perioda prema dostupnoj literaturi nisu pronađena.

Ovisno o razvojnom stadiju životinje i intenzitetu izazvane hipoksije, opseg neuronske disfunkcije u ovim modelima varira od teške, značajne patologije (ishemijski infarkt, nekroza bijele tvari, ozljede u talamusu, hipotalamusu, hipokampusu, krvarenja u lateralnim komorama i moždanom



parenhimu, upale s lučenjem citokina, masivna aktivacija mikroglije i astroglije) koja naglo prekida većinu razvojnih procesa, do manje teških lezija kao što su narušena organiziranost bačvastih polja (engl. *barrel fields*) u somatosenzoričkoj moždanoj kori, fokalni gubitak neurona, edem, i sl. (93,94,100–103). Zbog ozbiljnosti ozljede viđena je astrocitna i mikroglijalna reaktivnost 24 sata (100) i 72 sata nakon ozljede (104). Zabilježena je akutna apoptoza stanica (99,105) koja se očituje povećanim izražajem cijepanog proteina kaspaze-3 (106,107) i čimbenika izazvanog hipoksijom-1 $\alpha$  (engl. *hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$*  – Hif-1 $\alpha$ ). Nalazi testiranja ponašanja ukazuju na nedostatke u prostornoj memoriji u rješavanju Morisovog vodenog labirinta (engl. *Morris water maze*, MWM) (105,107), poremećene motoričke i slušne sposobnosti te poremećaje u rješavanju drugih zadataka učenja/pamćenja (108).

Međutim, iako su mnoge studije koristile ove animalne modele, istraživanja umjerene kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije i njezinih dugoročnih učinaka, osobito na strukturnoj (histološkoj) i funkcionalnoj (bihevioralnoj) razini mozga, nedostaju ili su oskudna (61,70). Umjerena hipoksija često se javlja u fetusa i prijevremeno rođene djece, ali nerijetko prolazi neprimijećeno i često biva prepoznata tek kasnije kao uzrok kognitivnih ili bihevioralnih nedostataka tijekom ranih školskih dana ili adolescencije. Ti su nedostaci povezani s razvojnim hipoksijskim incidentom koji uzrokuje suptilnu do umjerenu patologiju bijele tvari ili kortikalne mikrostrukture (66,109–111).

Stoga je molekularni i histološki pristup u ovom istraživanju važan kako bi se poznavali mehanizmi koji dovode do hipoksijske ozljede u ranoj postnatalnoj dobi. Nadalje, bihevioralni pristup u adolescenciji i odrasloj dobi važan je kako bi se utvrdilo koji se nedostaci javljaju, koji od tih nedostataka bi mogli odgovarati nedostacima tijekom adolescencije u ljudi, koji su mogući kompenzacijski mehanizmi (sinaptogeneza, neuroprotekcija, sinaptička plastičnost) i koje su promjene još prisutne u odrasloj dobi.

#### **1.4. Svrha rada**

U ovom istraživanju predviđa se perinatalna hipoksijska ozljeda mozga štakora prvog postnatalnog dana koja po svom načinu nastanka i intenzitetu nije do sada opisivana u literaturi. Dosadašnja istraživanja opisuju snažniju hipoksiju ili kombiniranje hipoksije i ishemije s posljedičnim opsežnim upalnim procesima te motoričkim i drugim nedostacima. Cilj ovog istraživanja jest istražiti učinak umjerene neinvazivne kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksijske ozljede u mladih i odraslih štakora na razini histoarhitektonike mozga, pojavu upalnih procesa i degradaciju stanica, promjene u sastavu i strukturi PNN-ova te obrascima ponašanja, koji prema dostupnoj literaturi još nisu istraženi.

## **2. HIPOTEZA**

Izražaj perineuronskih mreža je kvalitativno i kvantitativno promijenjen u mozgu štakora odrasle dobi nakon kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije.

### **3. CILJEVI RADA**

#### **3.1. Opći cilj**

Opisati kvalitativne i kvantitativne promjene perineuronskih mreža u mozgu štakora odrasle dobi nakon kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije.

#### **3.2. Specifični ciljevi**

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

1. Prikazati perineuronske mreže (morfologiju i molekularne sastavnice) uz normotipični perinatalni razvitak mozga Wistar Han (RccHan:WIST) štakora oba spola u područjima srednje moždane kore cingularne vijuge i hipokampusa.
2. Prikazati perineuronske mreže (morfologiju i molekularne sastavnice) mozga Wistar Han (RccHan:WIST) štakora oba spola u području srednje moždane kore cingularne vijuge i hipokampusa nakon kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije.
3. Odrediti izvanstanični i stanični supstrat hipoksijske ozljede u mozgu Wistar Han (RccHan:WIST) štakora oba spola dobi P1 nakon kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije imunohistokemijskim metodama.
4. Usporedna analiza promjena perineuronskih mreža u odnosu na moguća odstupanja u motorici i spoznajnim sposobnostima Wistar Han (RccHan:WIST) štakora oba spola procijenjeno primjenom testova ponašanja: test otvorenog polja, test ploče s rupama, test socijalnog izbora, T-labirint u mladoj (P30) i odrasloj (P70) dobi.

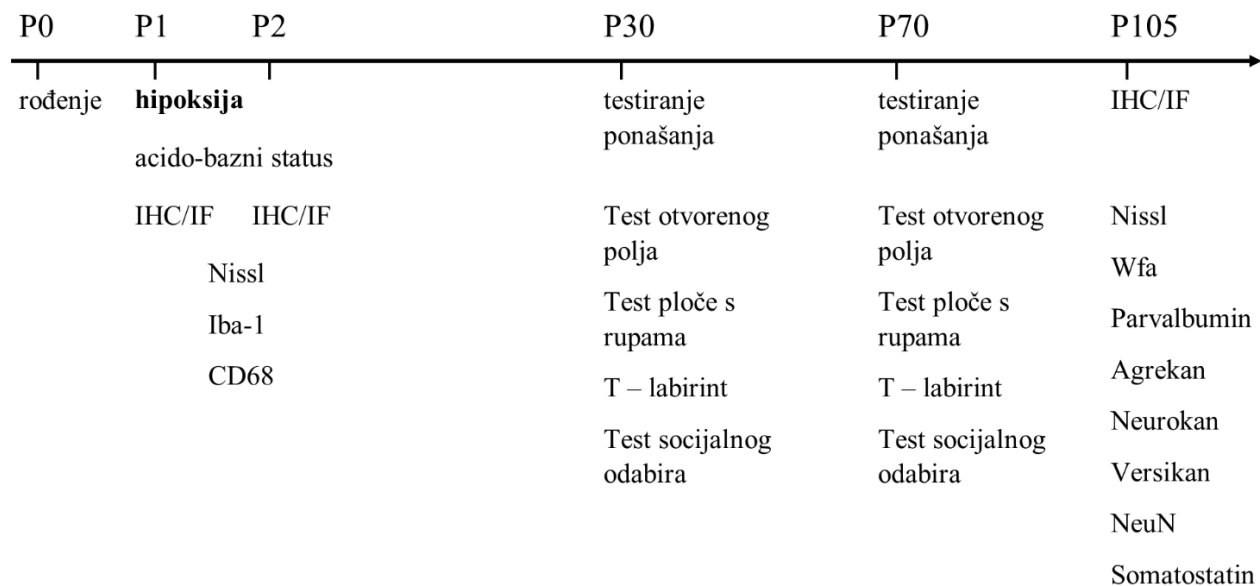
## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Materijali

Dizajn istraživanja, svi *in vivo* pokusi i uzorkovanja na laboratorijskim životinjama za ovo istraživanje odobreni su 2019. godine od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta (Ur.br. 380-59-10106-19-111/210) i Etičkog povjerenstva za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (EP231/2019; UP/I-322-01/19-01/75 Ur.br. 525-10/0543-20-4). Svi eksperimentalni postupci na laboratorijskim životinjama provedeni su u skladu sa zakonskom regulativom: Zakon o zaštiti životinja (NN 102/17; NN 32/19) (112,113); Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/2013; NN 39/17; NN 116/2019) (114–116), a opisani su prema ARRIVE smjernicama (engl. *Animal Research Reporting of In Vivo Experiment*) (117).

Sveukupno je korišteno 64 Wistar Han (RccHan:WIST) štakora P1 oba spola (32 ženke i 32 mužjaka) (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Odsjek za laboratorijske životinje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga). Novorođeni štakori bili su odvojeni od majki, razlikovani prema spolu i svrstani u dvije skupine: hipoksijsku (sveukupno 16 ženki i 18 mužjaka) i kontrolnu (sveukupno 16 ženki i 14 mužjaka). 12 štakora, odnosno 6 mužjaka i 6 ženki, žrtvovano je u dobi P1, odnosno odmah nakon inducirane hipoksije (3 ženke i 3 mužjaka iz hipoksijske skupine, 3 ženke i 3 mužjaka iz kontrolne skupine) za analizu acidobaznog statusa. 12 štakora, odnosno 6 mužjaka i 6 ženki, žrtvovano je u dobi P1, odnosno 8 sati nakon inducirane hipoksije (1 ženka i 2 mužjaka iz hipoksijske skupine, 2 ženke i 1 mužjak iz kontrolne skupine) i 24 sata nakon inducirane hipoksije (2 ženke i 1 mužjak iz hipoksijske skupine, 1 ženka i 2 mužjaka iz kontrolne skupine) za imunohistokemijsku analizu mikroglije i makrofaga. 40 štakora, odnosno 20 ženki i 20 mužjaka (10 ženki i 12 mužjaka iz hipoksijske skupine, 10 ženki i 8 mužjaka iz kontrolne skupine) korišteni su za testiranje ponašanja u mladoj P30 i odrasloj P70 dobi. 30 štakora, odnosno 16 ženki i 14 mužjaka (9 ženki i 7 mužjaka iz hipoksijske skupine, 7 ženki i 7 mužjaka iz kontrolne skupine) nakon testiranja ponašanja žrtvovano je u dobi od 3,5 mjeseca odnosno P105 za imunohistokemijsku analizu izražaja PNN-ova i njihovih sastavnica.

Vremenska linija koja prikazuje dizajn istraživanja prikazana je u slici 6, dok je broj korištenih štakora po eksperimentu u ovome istraživanju opisan u tablici 1. Prema definiciji Pravilnika o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/2013, prilog VII), štakori su bili podvrgnuti postupcima koji spadaju u blage – kontrolna skupina (odvajanje od majki kroz 2 sata); testiranje ponašanja – test otvorenog polja, test ploče s rupama, T-labirint, test socijalnog odabira (kontrolna i hipoksijska skupina); i umjerene: hipoksijska skupina izložena hipoksijskim uvjetima.



**Slika 6.** Vremenska linija dizajna istraživanja. *Wistar Han (RccHan:WIST) štakori su 24 sata nakon rođenja podvrgnuti hipoksijskim ili kontrolnim uvjetima. Dio štakora žrtvovan je odmah nakon inducirane hipoksije za analizu acidobaznog statusa. Dio štakora žrtvovan je 8 sati i 24 sata nakon inducirane hipoksije u svrhu histološke i imunohistokemijske analize. S 30 i 70 dana starosti dio štakora podvrgnut je testiranju ponašanja koristeći test otvorenog polja (engl. open field), test ploče s rupama (engl. hole board), T-labirint (engl. T-maze) i test socijalnog odabira (engl. social choice). Rezultati testiranja ponašanja detaljno su opisani u objavljenom radu: Trnski i sur. 2022. (129) koji se nalazi na kraju ovog doktorskog rada. Isti štakori žrtvovani su u dobi od 3,5 mjeseca za histološke i imunohistokemijske analize.*

**Tablica 1.** Broj korištenih Wistar Han (RccHan:WIST) štakora po dobi, spolu i eksperimentu.

EKSPERIMENT	DOB (Pri uzorkovanju)	UKUPAN BROJ Wistar Han štakora	HIPOKSIJSKA SKUPINA	KONTROLNA SKUPINA
HIPOKSIJA	P1	64 (32Ž; 32M)	34 (16Ž; 18M)	30 (16Ž; 14M)
ACIDOBAZNI STATUS	P1	12 (6Ž; 6M)	6 (3Ž; 3M)	6 (3Ž; 3M)
IMUNOHISTO- KEMIJSKI EKSPERIMENTI I ANALIZA	P1	12 (6Ž; 6M)	6 (3Ž; 3M)	6 (3Ž; 3M)
	8h nakon hipoksije	6 (3Ž; 3M)	3 (1Ž; 2M)	3 (2Ž; 1M)
	24h nakon hipoksije	6 (3Ž; 3M)	3 (2Ž; 1M)	3 (1Ž; 2M)
	P105	30 (16Ž; 14M)	16 (9Ž; 7M)	14 (7Ž; 7M)
TESTIRANJE PONAŠANJA	P30 I P70	40 (20Ž; 20M)	22 (10Ž; 12M)	18 (10Ž; 8M)

Prilikom izrade dizajna istraživanja i provođenja samog eksperimenta primijenila su se 3R načela (engl. *Replacement*, *Reduction*, *Refinement*).

Zamjena (engl. *replacement*) animalnog modela nije bila moguća jer se utjecaj HI ozljede mozga na motoričke, spoznajne i bihevioralne sposobnosti ne može istraživati u modelima *in vitro* ili kompjutorskim simulacijama. Konzultiranjem literature koja nudi alternativne postupke s 3R (NC3RS, AltWeb, AnimaAlt ZEBET, Go3R, pristupljeno 01.10.2019.) nije pronađena ni jedna alternativna metoda za ispitivanje učenja i pamćenja.

Smanjenje (engl. *reduction*) broja laboratorijskih životinja u ovoj studiji bio je imperativ. Minimalan broj laboratorijskih životinja potreban za ovo istraživanje određen je analizom snage statističkog testa koristeći G\*Power statistički program za određivanje veličine uzorka u istraživanju koji je slobodno dostupan putem poveznice [https://download.cnet.com/G-Power/3000-2054\\_4-10647044.html](https://download.cnet.com/G-Power/3000-2054_4-10647044.html) i temeljem recentnih istraživanja u području. Kriteriji za

statističku procjenu broja životinja su: snaga testa 80 % (za uobičajena biomedicinska istraživanja), razina značajnosti 0,05 te veličina učinka izračunata prema Cohenovoj formuli (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK43321/> [http://www.3rs-reduction.co.uk/html/6\\_power\\_and\\_sample\\_size.html](http://www.3rs-reduction.co.uk/html/6_power_and_sample_size.html)). Za ovo istraživanje predviđeno je minimalno 12 laboratorijskih životinja po pokusu, 6 kontrolnih i 6 hipoksijskih, u svakoj skupini 3 jedinke po spolu, što je najmanji mogući broj laboratorijskih životinja koje je moguće koristiti po ispitivanju učinka hipoksije na određeni parametar, a da bi se mogla dobiti statistička značajnost. Kako bi se smanjio broj laboratorijskih životinja, a povećala njihova iskoristivost i efektivnost ove studije, iste laboratorijske životinje bile su izložene nizu eksperimenata – hipoksijskim ili kontrolnim uvjetima tijekom 2 sata, zatim testiranju ponašanja u mladoj i odrasloj dobi te na koncu žrtvovanju u odrasloj dobi od 3,5 mjeseca čije se moždano tkivo koristilo za histološka i imunohistokemijska istraživanja. Na taj način dobiveno je od iste laboratorijske životinje niz važnih i kvalitetnih informacija iz cijelog niza studija.

Poboljšanje (engl. *refinement*) ovog istraživanja napravljeno je iz aspekta smanjenja broja laboratorijskih životinja, njihove bolje iskoristivosti te primjene suvremenih spoznaja o dobrobiti laboratorijskih životinja, što boljoj i kvalitetnijoj brizi za laboratorijske životinje koja uključuje zdravstveni nadzor, standardne uvjete smještaja, edukaciju osoblja koje provodi svakodnevnu brigu o laboratorijskim životinjama, edukaciju voditelja pokusa ovog istraživanja i primjenu suvremenih metoda s ciljem smanjivanja boli, patnje i/ili tjeskobe laboratorijskih životinja. Vodilo se računa o zdravstvenom statusu laboratorijskih životinja prateći primjere dobre veterinarske prakse i koristeći najnovija saznanja iz područja brige i dobrobiti laboratorijskih životinja u skladu s opće prihvaćenim relevantnim stručnim izvorima i referencama, koje osigurava najmanju moguću patnju laboratorijskih životinja i uspješnost postupka u svrhu provedbe znanstvenog istraživanja (118–127). Ovo istraživanje ne uključuje primjenu invazivnih metoda. Ovako dizajnirani pokus je poboljšanje dosadašnjih animalnih modela koji se koriste u svrhu istraživanja perinatalnih ozljeda mozga.

Osim 3R načela prilikom dizajna ovog istraživanja vodilo se računa i o 4A odgovornih pokusa na laboratorijskim životinjama – 1) svijest (engl. *Awareness*) o patnji koju proživljava pokusna životinja tijekom pokusa, 2) potreba da se prouče (engl. *Assess*) svi postupci na životinjama kako bi se što više 3) izbjegla (engl. *Avoid*) ili 4) ublažila (engl. *Alleviate*) patnja životinja u pokusu.



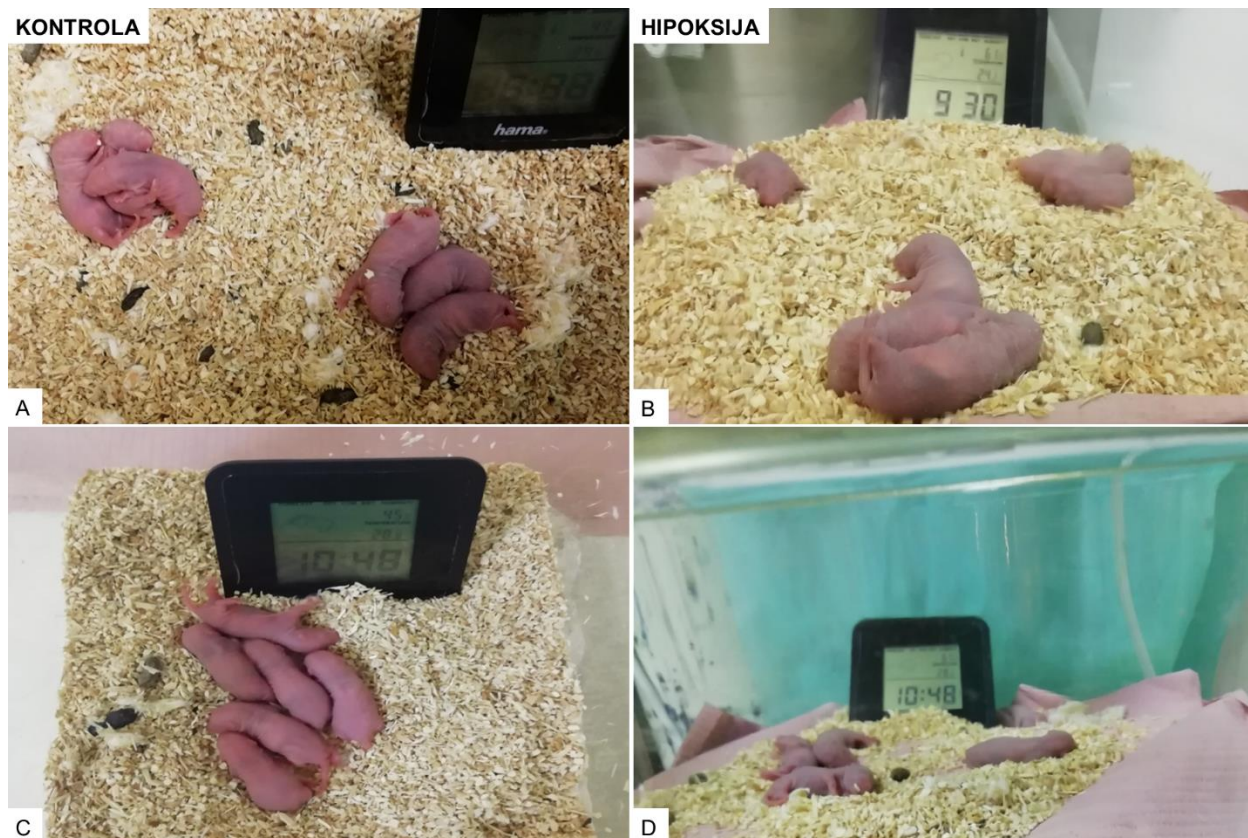
Laboratorijske životinje bez specifičnih patogena (engl. *Specific Pathogen Free* – SPF) smještene su na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Odsjeku za laboratorijske životinje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga (HR POK 006 MP RH). Laboratorijske životinje uzgajane su u standardnim konvencionalnim uvjetima uz dezinfekcijske barijere te pristup samo educiranom i licenciranom osoblju kroz propisane koridore. Laboratorijske životinje smještene su u polisulfonskim (PSU) transparentnim kavezima koji podržavaju visoke temperature autoklaviranja (1354G – Eurostandard tip IV; dimenzije: 598 mm dužine, 380 mm širine, 200 mm visine; površine 1820 cm<sup>2</sup>; TECNIPLAST S.p.A., Buguggiate, Italija). U kavezima je korištena stelja za laboratorijske životinje bez sadržaja prašine (engl. *dust free*) (Scobis I PF3907; Scobis II PF3903; Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija) kao standardni način smještaja laboratorijskih štakora te materijal za izradu gnijezda bez sadržaja prašine (Scobis zero PF3906; Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija) kod gravidnih ženki i odgoja mladunaca. Laboratorijskim životinjama je dostupna standardna hrana za miševе i štakore: potpuna hrana za miševе i štakore – održavanje kratkog i srednjeg razdoblja u obliku peleta veličine 12 mm (4RF21C; Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija); potpuna hrana za miševе i štakore – reprodukcija, odvajanje i rast u obliku peleta veličine 12 mm (4RF25C; Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija) i pitka voda u skladu s propisanim minimalnim standardima (3–7) *ad libitum*. Laboratorijskim životinjama redovito su mijenjane hrana, stelja i pitka voda. Odvoz i neškodljivo uklanjanje lešina te odvoz korištene stelje kao materijal kategorije 1 i 2 redovito se provodi u okviru *SafeVet* pogona za preradu materijala kategorija 1 i 2 (Agroproteinka d.d., Sesvete, Hrvatska). U nastambi za smještaj laboratorijskih životinja osigurani su optimalni i kontrolirani uvjeti okoliša – temperatura zraka ( $22 \pm 2$  °C), vlaga ( $55 \pm 15$  %), ciklička izmjena zraka (12 izmjena u danu) LED (engl. *light-emitting diode*) osvjetljenje do 300 lx i ciklička izmjena perioda svjetla i tame (dan/noć) u trajanju 12:12 sati gdje svjetlosni period počinje u 07:00 sati i traje do 19:00 sati. Nakon odvajanja od majki (P30) laboratorijske životinje za daljnja eksperimentalna istraživanja smještene su u skupinama po tri laboratorijske životinje istog spola u istom kavezu (ženke kontrole, ženke hipoksija, mužjaci kontrole, mužjaci hipoksija). Obogaćivanje okoliša bilo je omogućeno gravidnim ženkama s materijalom za izradu gnijezda (Scobis zero PF3906; Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija) i za vrijeme odgoja mladunaca jestivim tunelima od celuloze koji su posebno dizajnirani za štakore, miševе i hrčke da se koriste kao skloništa i kućice (70869; Antrum 15; promjer 75 mm, dužina 148

mm; Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija) te zavijenim debelim štapićima od toaletnog papira s vrlo niskim sadržajem prašine (7979C.CS; *Diamond Twists*; Envigo Teklad, Indianapolis, SAD). Nakon odvajanja mladunaca od majki, kao i za vrijeme provođenja testiranja ponašanja, laboratorijske životinje bile su smještene bez obogaćenog okoliša. O laboratorijskim životinjama brinule su se i provodile eksperimente isključivo ženske osobe. Odsjek za laboratorijske životinje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga je I/II razine biološke sigurnosti životinja (engl. *Animal Biosafety Level* – ABSL I/II).

## 4.2. Metode

### 4.2.1. Izlaganje štakora P1 uvjetima kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije

Prema Kaur *i sur.* 2006. (128) napravljena je modifikacija protokola za izazivanje hipoksije. Wistar Han (RccHan:WIST) štakori su prvog postnatalnog dana odvojeni od majki te im je izmjerena tjelesna težina. Dan rođenja smatra se nultim postnatalnim danom (P0) sve do podneva idućeg dana kada počinje P1. Prosječna tjelesna težina štakora korištenih u eksperimentu je  $6,88 \text{ g} \pm 10 \%$ . Svi štakori koji su težili manje od 6 g ili više od 8 g nisu se koristili u eksperimentu. Zatim su štakori odgovarajuće tjelesne težine bili odvojeni prema spolu i nasumičnim razvrstavanjem svrstani u 4 skupine – ženke kontrola, ženke hipoksija, mužjaci kontrola, mužjaci hipoksija. Hipoksijsku skupinu čini jednaki broj ženki i mužjaka (3 ženke i 3 mužjaka po eksperimentu). Stavljani su u grijanu hipoksijsku komoru promjera 300 mm i volumena 12,9 litara zajedno s malo stelje iz kaveza gdje mladunci borave s majkama, termometrom i higrometrom pri uvjetima: temperatura zraka  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ ; parcijalni tlak kisika (engl. *partial pressure of O<sub>2</sub>*,  $p_{\text{O}_2}$ ) 9,7325 kPa (73 mm Hg); atmosferski tlak (engl. *atmospheric pressure*,  $p^{\text{ATM}}$ ) 46,6628 kPa (350 mm Hg) (slika 7B, D). Kontrolnu skupinu čini jednaki broj ženki i mužjaka (3 ženke i 3 mužjaka po eksperimentu). Stavljani su u manji, grijani kavez zajedno s malo stelje iz kaveza gdje mladunci borave s majkama, termometrom i higrometrom pri uvjetima: temperatura zraka  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $p_{\text{O}_2}$  21,1983 kPa (159 mm Hg);  $p^{\text{ATM}}$  101,3250 kPa (760 mm Hg) (slika 7A, C). Štakorima je inducirana hipoksija u trajanju od 2 sata. Odmah nakon provedene hipoksije mladunci su korišteni za analizu acidobaznog statusa ili vraćeni u kavez s majkama i korišteni kasnije u studiji (slika 6).



**Slika 7.** Fotografije mladunaca štakora P1 za vrijeme izvođenja eksperimenta kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije. Kontrolnu skupinu (A, C) čini jednaki broj mužjaka i ženki koje su tijekom izvođenja eksperimenta izloženi normoksijskim uvjetima ( $pO_2 = 21,1983 \text{ kPa}$  ( $159 \text{ mm Hg}$ );  $p^{ATM} = 101,3250 \text{ kPa}$  ( $760 \text{ mm Hg}$ )) u trajanju od 2 sata. Hipoksijsku skupinu (B, D) čini jednaki broj mužjaka i ženki koji su tijekom izvođenja eksperimenta izloženi hipoksijskim uvjetima ( $pO_2 = 9,7325 \text{ kPa}$  ( $73 \text{ mm Hg}$ );  $p^{ATM} = 46,6628 \text{ kPa}$  ( $350 \text{ mm Hg}$ )) u trajanju od 2 sata.

#### 4.2.2. Mjerenje acidobaznog statusa

Odmah nakon što su štakori P1 bili izloženi uvjetima kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije, 6 mladunaca po skupini (tablica 1) je dekapitirano na slijedeći način: 1 štakor je uzet iz hipoksijske komore, potom se komora odmah zatvorila kako bi se održavali hipoksijski uvjeti, štakor je dekapitiran pomoću škara i držan u vodoravnom položaju te se miješana arterijska i venozna krv sakupljala koristeći mini kapilarne cjevčice ( $75 \mu\text{l}$  po štakoru, odvojeno). Sadržaj kapilare odmah se iskapao u uređaj za trenutnu analizu acidobaznog statusa koristeći i-STAT Alinity analizator plinova (Abbott Point of Care Inc., Illinois, SAD). Zapornim satom mjerilo se

vrijeme od kada je štakor uzet iz komore do potpunog punjenja kazete (engl. *cartridge*) za analizu acidobaznog statusa iz krvi (i-STAT CG4 + White; 03P85-25; Abbott Point of Care Inc., Illinois, SAD) te se uzorci za čije je sakupljanje materijala prošlo više od 1 minute nisu uzimali u obzir. Isti postupak je ponovljen i za kontrolnu skupinu. Pomoću uređaja i-STAT *Alinity* analiza acidobaznog statusa bila je gotova za 130 sekundi te je nalaz odmah isprintan, označen i pohranjen. U svim prikupljenim uzorcima krvi izmjereni su slijedeći parametri: vodikov potencijal (engl. *potential of hydrogen*, pH) parcijalni tlak ugljikovog dioksida (engl. *partial pressure of CO<sub>2</sub>*, PCO<sub>2</sub>); pO<sub>2</sub>; bikarbonati (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>); višak lužina u izvanstaničnoj tekućini (engl. *base excess, extracellular fluid*, BE, ecf); saturacija kisikom (engl. *O<sub>2</sub> saturation*, sO<sub>2</sub>); ukupan ugljikov dioksid (engl. *total CO<sub>2</sub>*, TCO<sub>2</sub>); laktat.

#### 4.2.3. Testiranje ponašanja

Metode testiranja i procjene ponašanja životinja detaljno je opisano u objavljenom radu: Trnski *i sur.* 2022. (129) koji se nalazi na kraju ovog doktorskog rada.

#### 4.2.4. Žrtvovanje štakora P1 i P105

Za potrebe histološke i imunohistokemijske analize akutnih promjena na mozgu nakon izlaganja štakora uvjetima kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije žrtvovano je 12 štakora (6 ženki i 6 mužjaka) iz hipoksijske i kontrolne skupine dobi P1 8 sati i 24 sata nakon izlaganja štakora uvjetima kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije (tablica 1). Štakori dobi P1 anestetizirani su metodom pothlađivanja na + 4 °C (<https://www.bu.edu/researchsupport/compliance/animal-care/working-with-animals/anesthesia/anesthesia-and-analgesia-neonatal-mice-and-rats-iacuc/>) koristeći podlogu ispunjenu ledom i prekrivenu staničevinom u trajanju do 2 minute (130,131). Nakon potvrde da je štakor u dubokoj anesteziji pristupilo se transkardijalnoj perfuziji s 10 mL ledeno hladne otopine fosfatnog pufera (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2), zatim s 10 mL ledeno hladnog 4 % paraformaldehida (0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,4) (132) te konačno dekapitaciji štakora.

Za potrebe histološke i imunohistokemijske analize izražaja PNN-ova i njenih sastavnica nakon izlaganja štakora uvjetima kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije žrtvovano je 30 štakora (16 ženki i 14 mužjaka) iz hipoksijske i kontrolne skupine dobi P105 koji su prošli testiranje ponašanja u dobi P30 i P70, odnosno 3,5 mjeseca nakon izlaganja štakora uvjetima kontrolirane

kratkotrajne perinatalne hipoksije (tablica 1). Štakori su duboko anestetizirani intraperitonealnom aplikacijom kombinacije anestetika i analgetika u prekomjernoj dozi od 80 mg/kg ketamina (Bioveta, a. s., Češka Republika) i 10 mg/kg ksilazina (Bioveta, a. s., Češka Republika) (133) u izotoničnoj otopini. Po provjeri refleksa i potvrdi duboke anestezije (gubitak medijalnog i lateralnog palpebralnog refleksa, gubitak osjeta duboke boli ispitivan pritiskom pincete na zadnju trećinu repa i pritiskom na kožu između prstiju) štakor je dekapitiran.

Usmrćivanje laboratorijskih životinja provodile su osobe osposobljene u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja NN 102/2017, Čl. 11.; Čl. 24.

#### 4.2.5. Priprema moždanog tkiva za histološke i imunohistokemijske analize

8 sati i 24 sata nakon izlaganja štakora uvjetima kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije mozak je izvađen i fiksiran u 4 % puferiranoj otopini paraformaldehida (0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,4) tijekom 18 sati na + 4 °C. Uzorci moždanog tkiva krioprotektirani su uzlaznom serijom otopina saharoze (10 %, 20 %, 30 %) te brzo zamrznuti na - 80 °C u izopentanu. Mozak je narezan pomoću kriostata (CM1950; Leica Biosystems, USA) pri temperaturi od - 25 °C. Najprije je mozak zalijepljen na stalak za rezanje pomoću smjese za optimalnu temperaturu rezanja tkiva (engl. *optimal cutting temperature compound* – O.C.T. *Compound*, *Tissue-Tek*, Sakura Finetek, Europe B.V., Nizozemska) i zatim narezan na koronarne rezove debljine 60 µm na razini bregma 0,40 mm do bregma - 1,60 mm prema atlasu Ramachandra i Subramanian, 2011 (134). Rezovi moždanog tkiva koji su sadržavali razine od interesa stavljeni su u ledeno hladnu otopinu PBS-a (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2) koji sadrži 0,05 % natrijevog azida.

3,5 mjeseca nakon izlaganja štakora uvjetima kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije mozak je izvađen i fiksiran u 4 % puferiranoj otopini paraformaldehida (0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,4) tijekom 48 sati na + 4 °C. Uzorci moždanog tkiva zatim su dehidrirani uzlaznom serijom alkohola (70 %-tni etanol, 96 %-tni etanol, 100 %-tni etanol, toluol) te završno uronjeni u parafin niskog tališta. Mozak je narezan pomoću mikrotoma (Leica SM 2000R, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Njemačka) na koronarne rezove debljine 14 µm na razini bregma - 1,44 mm do bregma - 4,68 mm prema atlasu Paxinos i Watson, 2007 (135).

#### 4.2.6. Histološke i imunohistokemijske metode

##### 4.2.6.1. Krezil-violet bojenje, modifikacija metode po Nisslu

Za analizu mogućih strukturalnih promjena na moždanom tkivu korišteno je krezil-violet bojenje, modifikacija metode po Nisslu na koronarnim krioprotektiranim rezovima debljine 60 µm dobivenim 8 sati i 24 sata nakon izlaganja štakora uvjetima kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije te na deparafiniziranim koronarnim rezovima debljine 14 µm dobivenim 3,5 mjeseca nakon izlaganja štakora uvjetima kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije. Deparafinizacija je provedena silaznom serijom alkohola (ksilol, 100 %-tni etanol, 96 %-tni etanol, 70 %-tni etanol) te su rezovi zatim isprani u destiliranoj vodi. Korištena je 0,5 % krezil-violet boja (Chemika, Girraween, Australija) u destiliranoj vodi u omjeru 1:2 tijekom 10 minuta. Rezovi su zatim isprani u destiliranoj vodi te dehidrirani uzlaznom serijom alkohola (70 %-tni etanol uz dodatak par kapi 10 % octene kiseline (CH<sub>3</sub>COOH), 96 %-tni etanol, 100 %-tni etanol) te završno pročišćeni ksilolom i zatim Histo-Clear otopinom (Chemika, Girraween, Australija). Rezovi su zatim pokriveni koristeći Histomount (HS-103, National Diagnostics, Atlanta, SAD) sredstvo za pokrivanje (136).

##### 4.2.6.2. Imunohistokemija (engl. *immunohistochemistry*, IHC)

Za detekciju diferencijalnog izražaja specifičnih proteina kalcijevih iona (engl. *ionized calcium-binding adapter molecule 1*, Iba-1) – biljega mikroglije i makrofaga (štakorski CD68 klon ED1, koji je izražen na većini populacija makrofaga kao i na monocitima i smatra se pan-makrofagnim biljekom u štakora) na P1 mozgovima primijenjena je klasična IHC metoda na slobodno plutajućim (engl. *free-floating*) koronarnim smrznutim rezovima debljine 60 µm podudarajućih anatomskih razina (134) na hipoksijskim i kontrolnim mozgovima. Za detekciju PNN-ova oko PV neurona na P105 mozgovima, primijenjena je klasična IHC metoda standardna za PNN-ove s biotiniziranim Wfa (137), bojenje koje prepoznaje specifičnu glikozilaciju (N-acetilgalaktozamin vezan za galaktozu) glikoproteina u sastavu PNN-ova, a za izražaj PV neurona korišteno je anti-PV protutijelo (138) koje prepoznaje unutarstanični parvalbumin *alpha* protein, na deparafiniziranim koronarnim rezovima debljine 14 µm podudarajućih anatomskih razina (135) na hipoksijskim i kontrolnim mozgovima. Rezovi su isprani 3 x 10 minuta u PBS-u (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2), stavljeni u predtretman koji sadrži 0,3 % vodikovog peroksida u otopini metanola i vode

u omjeru 3:1 tijekom 30 min, isprani 10 minuta u PBS-u (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2), uronjeni na 1 sat u otopinu za blokiranje koja sadrži albumin iz goveđeg seruma, deterdžent triton i PBS (5 % BSA; 0,5 % TRITON/PBS) pri sobnoj temperaturi, zatim inkubirani u otopini koja sadrži primarno protutijelo (tablica 2) tijekom 24 sata za smrznute rezove (139), odnosno tijekom 48 sati za parafinske rezove (137,140) pri + 4 °C. Nakon toga rezovi su isprani 10 minuta u PBS-u (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2) te inkubirani adekvatnim biotiniziranim sekundarnim protutijelom (tablica 2) tijekom 1 sata pri sobnoj temperaturi. Nakon toga rezovi su ponovno isprani 10 minuta u PBS-u (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2), inkubirani u Vectastain ABC reagensu (streptavidin-peroksidaza kompleks) tijekom 1 sata pri sobnoj temperaturi, isprani 10 minuta u PBS-u (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2) te je aktivnost peroksidaze vizualizirana koristeći Ni-3,3-diaminobenzidine (SIGMAFAST DAB, D0426 Sigma-Aldrich, Saint Louis, SAD) tijekom 5 min (CD68, Parv, Wfa) ili 10 min (Iba-1). Nakon toga rezovi su ponovno isprani 10 minuta u PBS-u (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2) te završno pročišćeni Histo-Clear otopinom (Chemika, Girraween, Australija). Rezovi su zatim pokriveni koristeći Histomount (National Diagnostics, Atlanta, SAD) sredstvo za pokrivanje.

#### 4.2.6.3. Imunofluorescencija (IF)

Za analizu mogućih strukturalnih promjena na moždanom tkivu korišteno je Nissl bojenje (tablica 2) na deparafiniziranim koronarnim rezovima debljine 14 µm dobivenim 3,5 mjeseca nakon izlaganja štakora uvjetima kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije. Rezovi su rehidrirani 40 minuta u PBS-u (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2), zatim isprani 10 minuta u otopini koja sadrži PBS (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2) i 0,1 % deterdžent triton te ponovo isprani 5 minuta u PBS-u (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2). Rezovi su potom inkubirani s Nissl bojenjem (tablica 2) tijekom 2 sata, isprani 10 minuta u otopini koja sadrži PBS (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2) i 0,1 % deterdžent triton te ponovo isprani 2 x 5 minuta u PBS-u (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2). Rezovi su pokriveni koristeći vodeno pokrivalo (VectaMount, H-5501-60, Vector Laboratories, SAD) (141).

Za detekciju diferencijalnog izražaja biljega mikroglije na P1 mozgovima primijenjena je IF metoda na slobodno plutajućim koronarnim smrznutim rezovima debljine 60 µm podudarajućih anatomskih razina (134) na hipoksijskim i kontrolnim mozgovima. Za detekciju molekularnih

sastavnica PNN-ova – agrekana, neurokana, versikana i njihove kolokalizacije oko PV neurona te kolokalizacije PNN-ova oko nuklearnog biljega zrelih neurona (engl. *neuronal nuclear antigen*, NeuN), PV neurona i somatostatina na P105 mozgovima primijenjena je IF metoda dvostrukog obilježavanja (engl. *double-labeling*) na deparafiniziranim koronarnim rezovima debljine 14  $\mu\text{m}$  podudarajućih anatomskih razina (135) na hipoksijskim i kontrolnim mozgovima. Rezovi su isprani 10 minuta u PBS-u (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2), uronjeni na 1 sat u otopinu za blokiranje koja sadrži normalni magareći serum, deterdžent triton i PBS (5 % NDS; 0,5 % TRITON/PBS) pri sobnoj temperaturi, zatim inkubirani u otopini koja sadrži primarno protutijelo (tablica 2; izuzev negativne kontrole) tijekom 24 sata pri + 4 °C (137,140,142). Sljedećeg dana rezovi su isprani 10 minuta u PBS-u (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2) te inkubirani adekvatnim sekundarnim protutijelom (tablica 2) tijekom 2 sata pri sobnoj temperaturi. Nakon toga rezovi su ponovno isprani 10 minuta u PBS-u (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2) i pokriveni koristeći vodeno pokrivalo koje sadrži DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol; plava fluorescentna boja koja se snažno veže za područja bogata adenin-timinom u DNA) (VECTASHIELD with DAPI, H-1200-10, Vector Laboratories, SAD) za P1 mozgove, odnosno vodeno pokrivalo koje ne sadrži DAPI (VectaMount, H-5501-60, Vector Laboratories, SAD) za P105 mozgove. Ovako pripremljeni preparati pohranjeni su na + 4 °C sve do mikroskopske analize.

Negativne kontrole bile su uključene u sve IHC i IF eksperimente tako da se primarno protutijelo zamijenilo otopinom za blokiranje kozjim ili konjskim serumom, ili izostavljanjem sekundarnog protutijela ili njegova zamjena s neadekvatnim sekundarnim protutijelom. U negativnim kontrolnim rezovima nije zabilježena imunoreaktivnost.



**Tablica 2.** Popis primarnih i sekundarnih protutijela korištenih u IHC i IF metodama.

<b>Primarno protutijelo</b> <small>(naziv prema proizvođaču)</small>	<b>Kataloški broj</b>	<b>Domaćin, izotip</b>	<b>Razrjeđenje</b>	<b>Proizvođač</b>
Microglia marker Anti Iba1	019-19741	Zečje poliklonalno	1:1000	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, SAD
Mouse anti rat CD68 antibody, clone ED1	MCA341R	Mišje monoklonalno, pročišćeno, IgG1	1:200	Biorad, Hercules, Kalifornija, SAD
Anti-Parvalbumin	ab11427	Zečje poliklonalno, nekonjugirano, IgG	1:2000	Abcam, Cambridge, UK
Monoclonal Anti- Parvalbumin antibody produced in mouse	P3088	Mišje monoklonalno (PARV-19), nekonjugirano, IgG1	1:4000	Sigma-Aldrich, Saint Louis, SAD
Anti-Aggrecan	SAB4500662	Zečje poliklonalno, nekonjugirano, IgG	1:200	Sigma-Aldrich, Saint Louis, SAD
Anti-NCAN	HPA036814	Zečje poliklonalno, nekonjugirano	1:200	Sigma-Aldrich, Saint Louis, SAD
Human Versican Isoform V0 Antibody	AF3054	Kozje poliklonalno, pročišćeno, nekonjugirano, IgG	2,5 µg u 1 mL	Biotechne R&D Systems, Minneapolis, SAD
Rabbit anti- Somatostatin-14	T-4103	Zečje poliklonalno, nekonjugirano, IgG	1:5000	Peninsula Laboratories International, Inc., San Carlos, Kalifornija
Anti-NeuN Antibody	ab104225	Zečje poliklonalno, IgG	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
biotinylated Wisteria floribunda	L1516		6 µl u 1 mL	Sigma-Aldrich, Saint Louis, SAD

agglutinin (Bio-WFA)				
Fluorescein Wisteria Floribunda Lectin (WFA, WFL)	FL-1351		10 µg u 1 mL	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, SAD
NeuroTrace 640/660 Deep-Red Fluorescent Nissl Stain - Solution in DMSO	N-21483		1:150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD
<b>Sekundarno protutijelo</b>	<b>Kataloški broj</b>	<b>Domaćin, izotip</b>	<b>Razrjeđenje</b>	<b>Proizvođač</b>
VECTASTAIN ABC – HRP Kit, Peroxidase	PK-4002	Konjsko anti-mišje, IgG, biotinizirano	1:200	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, SAD
VECTASTAIN ABC – HRP Kit, Peroxidase	PK-4001	Kozje anti-zečje, IgG, biotinizirano	1:200	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, SAD
Alexa Fluor 488, Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody	A-21202	Magareće anti-mišje, IgG (H + L), poliklonalno	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD
Alexa Fluor 488, Cross-Adsorbed Secondary Antibody	A-11055	Magareće anti-kozje, IgG (H + L), poliklonalno	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD
Alexa Fluor 546, Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody	A10040	Magareće anti-zečje, IgG (H + L), poliklonalno,	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD
Alexa Fluor 555, Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody	A-31570	Magareće anti-mišje, IgG (H + L), poliklonalno	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD

#### 4.2.7. Kvalitativne i kvantitativne metode obrade rezultata

##### 4.2.7.1. Mikroskopija, snimanje i obrada digitalnih fotografija

Kvalitativna analiza histoloških rezova obojenih metodom klasične IHC napravljena je koristeći: Olympus Provis AX70 mikroskop (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Njemačka), a digitalne fotografije snimljene Nikon Eclipse 1200DXM kamerom; Olympus IX83 mikroskop (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Njemačka), 10x objektiv (UPLSAPO10x2, NA 0,4), a digitalne fotografije snimljene ORCA-flash 4,0 kamerom (C13440-20CU; Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Njemačka) pomoću CellSens programa (CellSens Dimension imaging software IX3-BSW) 2048 x 2048 piksel rezolucije. Analiza histoloških rezova obojenih IF metodom i IF metodom dvostrukog obilježavanja napravljena je koristeći konfokalni Olympus FV3000 mikroskop (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Njemačka), 40x objektiv (UPlanSApo, NA 1,25), 10x objektiv (UPlanSApo, NA 0,40), a digitalne fotografije snimljene pomoću CellSens programa (CellSens Dimension imaging software FV31S-SW) 2048 x 2048 piksel rezolucije; Olympus BX53 mikroskop (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Njemačka), 60x objektiv (UPlanXApo, NA 1,42 s uljnom imerzijom), a digitalne fotografije snimljene CoolLED pE-4000 kamerom (CS0459; CoolLED Ltd. Andover, UK) pomoću CellSens programa (CellSens Dimension imaging software BX53(U-CBM)) 2048 x 2048 piksel rezolucije.

##### 4.2.7.2. Kvantifikacija PNN-ova i PV neurona

Broj PNN-ova i PV neurona analiziran je na koronarnim rezovima debljine 14  $\mu\text{m}$  podudarajućih anatomskih razina (135) iz hipoksijskih i kontrolnih mozгова 3,5 mjeseca nakon kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije. Rezovi su obojeni kako je gore navedeno. Broj PNN-ova i PV neurona u području CG-a analiziran je na razini bregma - 1,56 mm do bregma - 1,92 mm za polje MCC-a i bregma - 2,04 mm do bregma - 2,92 mm za polje RSC-a (135). Broj PNN-ova i PV neurona u hipokampusu analiziran je u 4 razine: bregma - 2,92 mm; bregma - 3,36 mm; bregma - 4,20 mm; bregma - 4,56 mm (135). Da bi se mogli koristiti u analizi, rezovi su morali ispunjavati slijedeće kriterije: zadovoljavajuća kvaliteta reza odnosno samog tkiva; zadovoljavajući intenzitet bojenja bez značajnih odstupanja između rezova; zadovoljavajući intenzitet bojenja pozadine koji je minimalan na izabranim rezovima; odgovarajuća i podudarajuća razina između kontrolnih i hipoksijskih rezova prema atlasu Paxinos i Watson (135). Na taj način za analizu je izabrano

sveukupno 16 štakora (9 ženki i 7 mužjaka), od čega 9 štakora iz hipoksijske (5 ženki i 4 mužjaka) i 7 štakora iz kontrolne (4 ženke i 3 mužjaka) skupine za MCC i RSC te sveukupno 18 štakora (9 ženki i 9 mužjaka), od čega 10 štakora iz hipoksijske (5 ženki i 5 mužjaka) i 8 štakora iz kontrolne (4 ženke i 4 mužjaka) skupine za hipokampus. Brojenje PNN-ova i PV neurona provedeno je koristeći motorizirani mikroskopski sustav baziran na računalu i program Neurolucida inačica 2020 (Neurolucida software version 2020; MBF–Bioscience, Williston, VT, SAD). Sustav se sastoji od motoriziranog mikroskopa Olympus BX61 po z-osi opremljenog s x-y motoriziranim stupnjem vođenim MAC5000 kontrolorom stupnja (Ludl Electronic Products Ltd, Hawthorne, NY, SAD). Kvantifikacija za oba bojenja rađena je na 3 reza po svakom staklu u svakoj razini za svakog štakora u područjima i poljima od interesa. Pomoću programa Neurolucida Explorer i funkcije *Markers and Region Analysis* dobiveni su rezultati ukupne površine ( $\mu\text{m}^2$ ) i ukupnog broja (N) PNN-ova ili PV neurona u MCC-u, RSC-u i hipokampusu, s time da su površina i broj PNN-ova i PV neurona u hipokampusu izračunati u sva 3 polja – CA1, CA2, CA3 i u GD-u. Podatci su obrađeni izračunavanjem srednjih vrijednosti po štakoru ( $\text{N}/\text{mm}^2$ ) u MCC-u i RSC-u, odnosno izračunavanjem medijana po štakoru ( $\text{N}/\text{mm}^2$ ) u hipokampusu da bi se usporedile dvije skupine - hipoksijska i kontrolna. Tijekom kvantifikacije, istraživaču nije bila dostupna informacija o skupini koju analizira.

#### 4.2.8. Statistička analiza

Za rezultate dobivene analizom acidobazne ravnoteže, kvantifikacijom broja PNN/ $\text{mm}^2$  i PV/ $\text{mm}^2$  u MCC-u i RSC-u, kao i za rezultate dobivene kvantifikacijom broja PNN/ $\text{mm}^2$  i PV/ $\text{mm}^2$  u poljima CA1, CA2, CA3, u GD-u i cijelom hipokampusu, statistička analiza provedena je koristeći GraphPad Prism 9 statistički program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, SAD). Zbog malog broja uzoraka nije bilo moguće sa sigurnošću dokazati normalnu raspodjelu podataka za rezultate acidobaznog statusa, pa je stoga korišten neuparen, neparametrijski Mann-Whitney test. Vrijednosti u tekstu izražene su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Nezavisna dvosmjerna analiza varijance (engl. *two-way* ANOVA) korištena je za utvrđivanje utjecaja hipoksije i spola na broj PNN/ $\text{mm}^2$  i PV/ $\text{mm}^2$  u MCC-u i RSC-u, a Tukeyjev test značajnosti korišten je za *post-hoc* analizu. Vrijednosti u tekstu izražene su kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. Za utvrđivanje utjecaja hipoksije i spola na broj PNN/ $\text{mm}^2$  i PV/ $\text{mm}^2$  u poljima CA1, CA2, CA3, u GD-u i u cijelom hipokampusu korišten je neuparen, neparametrijski Mann-Whitney test.

Uspoređivani su medijani dobiveni od svih  $N/mm^2$  u sve 4 razine za svako polje za svakog štakora, a za cijeli hipokampus medijani dobiveni od svih  $N/mm^2$  u sve 4 razine u sva 4 polja za svakog štakora. Vrijednosti u tekstu izražene su kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. Za utvrđivanje utjecaja hipoksije na broj PNN/ $mm^2$  i PV/ $mm^2$  u cijelom hipokampusu korištena je ugniježđena (engl. *Nested*) analiza. Uspoređivani su dobiveni  $N/mm^2$  po rezu za cijeli hipokampus na način da  $N/mm^2$  označava zbroj svih PNN/ $mm^2$  ili PV/ $mm^2$  u sva 4 polja podijeljen sa zbrojem površine u sva 4 polja za svaki rez u svakoj razini za svakog štakora. Vrijednosti u tekstu izražene su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti (od engl. *standard error of mean*, SEM). Za utvrđivanje omjera PNN/PV medijani dobiveni za PNN-ove od svih PNN/ $mm^2$  u sve 4 razine za svako polje za svakog štakora podijeljeni su s medijanom dobivenim za PV neurone od svih PV/ $mm^2$  u sve 4 razine za svako polje za svakog štakora, vrijednosti u tekstu izražene su kao medijan. Razina značajnosti u svim korištenim statističkim testovima postavljena je na 0,05 (tj., značajnom se smatrala p vrijednost  $< 0,05$ ).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Klinička slika štakora P1 u uvjetima hipoksije

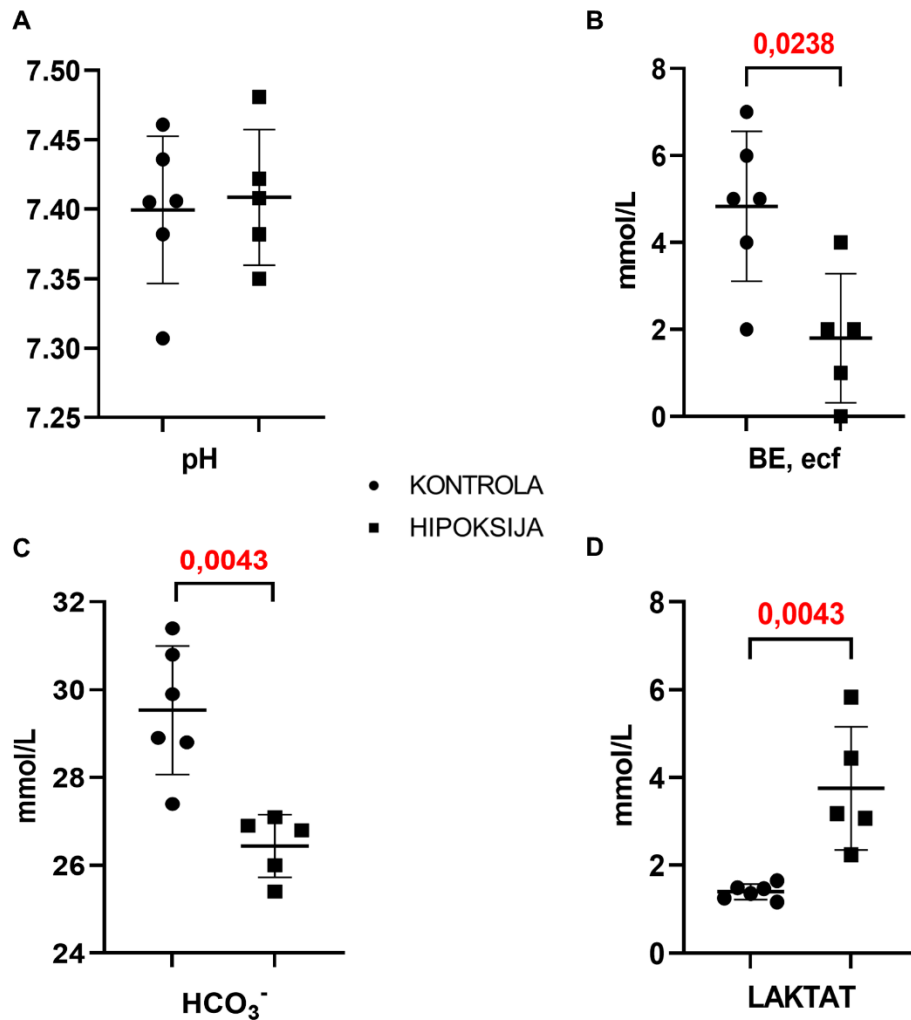
Dok su štakori P1 bili izloženi uvjetima perinatalne hipoksije, mladunci u hipoksijskoj komori razvili su simptome hipoksije koji uključuju: nemir, veslanje nožicama, neprestane pokrete, disanje tipično za „glad za kisikom“ (dahtanje, kratkoća daha), konvulzivne trzaje cijelog tijela, ponavljajući tremor glave, opću cijanozu. Ovi simptomi dosegli su svoj vrhunac jedan sat od početka hipoksije, a zatim su se postepeno smanjivali po intenzitetu do kraja provođenja hipoksije. Nakon završetka pokusa štakori iz hipoksijske skupine bili su hladni i cijanotični (slika 7B, D) u usporedbi s kontrolnom skupinom (slika 7A, C). Štakori kontrolne skupine bili su mirni, grupirani, imali su normalno tiho konstantno disanje, normalnu tjelesnu temperaturu i boju kože. Izlaganje hipoksiji nije dovelo do uginuća ili oboljenja u hipoksijskih štakora. Ubrzo nakon izlaganja uvjetima perinatalne hipoksije mladunci iz hipoksijske komore bili su naizgled zdravi i ponašali su se i razvijali primjereno dobi. Tijekom babinja pratio se tjelesni razvoj mladunaca – odvajanje uški, izbijanje gornjih i donjih sjekutića, pojava lanugo dlačnog pokrivača i razvitak krzna, odvajanje očnih spojnica, pojava vaginalnog otvora, spuštanje testisa u skrotum. U ovom razdoblju nisu bile zabilježene razlike u tjelesnom razvoju između hipoksijske i kontrolne skupine. Također, mladunci obje skupine bili su simetričnog tijela, sposobni micati sva 4 ekstremiteta spontano, aktivne vokalizacije koja je u prvim danima života bila izraženija te je bila prisutna spontana aktivnost čiji se stupanj povećavao s dobi životinje.

### 5.2. Izvanstanični i stanični supstrat hipoksijske ozljede u mozgu štakora P1 nakon perinatalne hipoksije

#### 5.2.1. Acidobazna ravnoteža nakon perinatalne hipoksije

Neposredno nakon što su štakori P1 bili izloženi uvjetima perinatalne hipoksije izmjeren je akutni metabolički odgovor procjenom acidobaznog statusa hipoksijske i kontrolne skupine. Procjena acidobaznog statusa potvrdila je metabolički pomak, odnosno statistički značajno smanjenje BE, ecf-a ( $p = 0,0238$ ; slika 8B), statistički značajno smanjenje bikarbonata ( $p = 0,0043$ ; slika 8C) i statistički značajno povišenje koncentracije laktata ( $p = 0,0043$ ; slika 8D) u krvi štakora iz hipoksijske skupine kao posljedicu akutnog generaliziranog hipoksijskog stresa. Iako su štakori iz

hipoksijske skupine tijekom izlaganja uvjetima perinatalne hipoksije u hipoksijskoj komori razvili blage do teške simptome hipoksije (opisano u 5.1.), vrijednosti pH-a u krvi održale su se unutar fiziološkog raspona (slika 8A). Ovi nalazi upućuju na dovoljan kapacitet izvanstaničnih pufera i brzo postizanje acidobazne homeostaze nakon izlaganja štakora uvjetima perinatalne hipoksije.



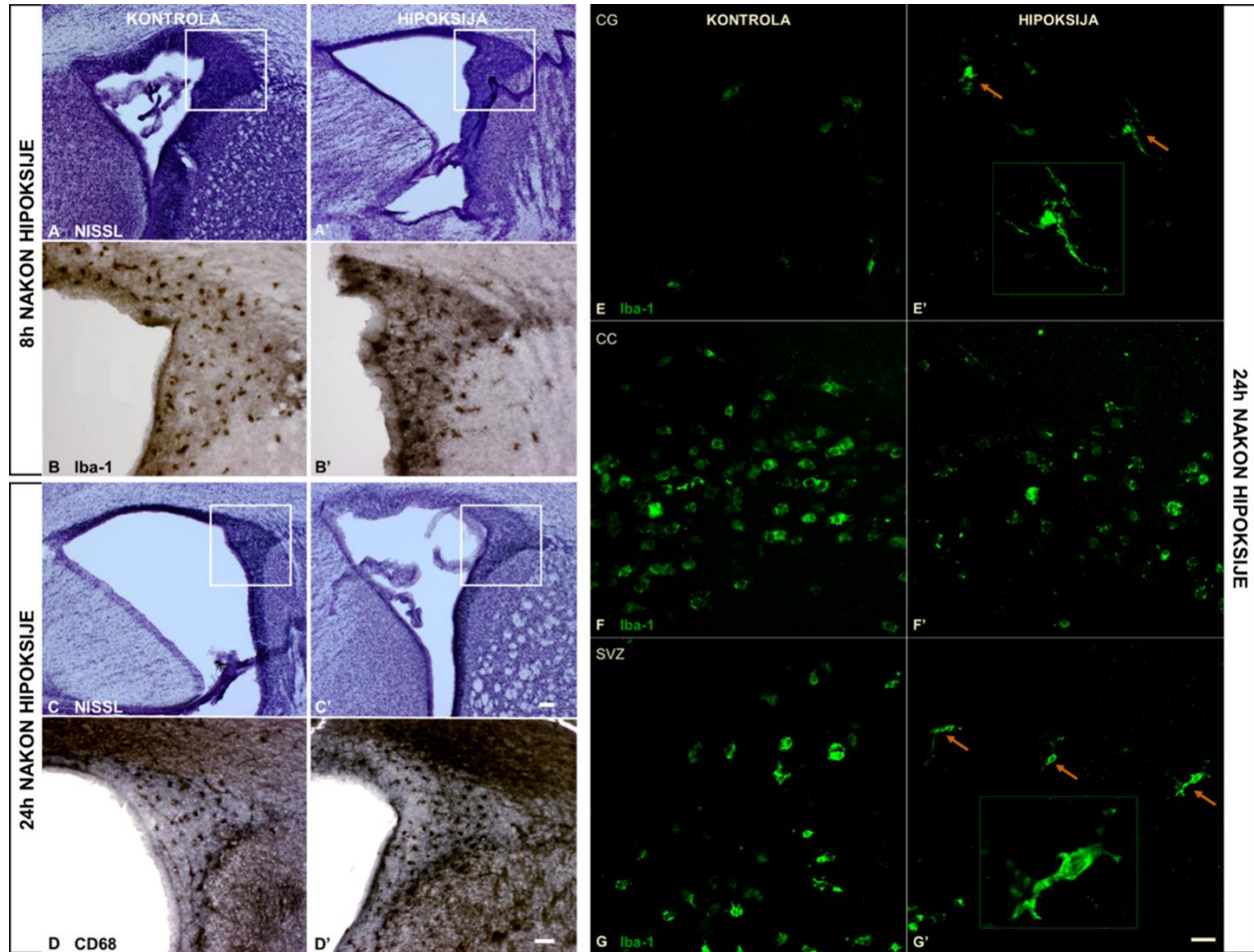
**Slika 8.** Vrijednosti različitih parametara iz krvi prikazuju acidobazni status mjeren neposredno nakon što su štakori P1 bili izloženi uvjetima perinatalne hipoksije. Grafički prikaz objavljen u radu: Trnski i sur. 2022.(129). A) Dobivene vrijednosti pH-a govore u prilog dovoljnom kompenzacijskom kapacitetu koji poboljšava neravnotežu elektrolita u novorođenih štakora. B) BE, ecf pokazuje značajno niže vrijednosti kod štakora iz hipoksijske skupine zbog iscrpljivanja baznih pufera za kompenzaciju metaboličke acidoze. C, D) Koncentracije bikarbonata i laktata u

*krvi pokazuju statistički značajne razlike između hipoksijske i kontrolne skupine, što dokazuje pomak s aerobnog na anaerobno metaboličko stanje u tkivu kao posljedicu hipoksije. Vrijednosti na grafikonima prikazane su kao srednja vrijednost  $\pm$  SD od 5 – 6 životinja po skupini.*

#### 5.2.2. Promjene u morfologiji mikroglialnih stanica i makrofaga u moždanoj kori cingularne vijuge, žuljevitom tijelu i subventrikularnoj zoni 8 sati i 24 sata nakon perinatalne hipoksije

Kvalitativna analiza histoloških rezova obojenih modifikacijom metode po Nisslu pokazala je da nema znakova većih patoloških ili anatomskih promjena, ali ipak je bilo vidljivo smanjenje gustoće stanica u subventrikularnoj zoni (SVZ) u hipoksijskoj skupini 8 sati nakon perinatalne hipoksije (slika 9A'), što je bilo još izraženije 24 sata nakon perinatalne hipoksije (slika 9C') u usporedbi sa SVZ-om kontrolne skupine (slika 9A, C). Kvalitativna analiza histoloških rezova obojenih metodom klasične IHC za detekciju biljega mikroglije pokazala je da je u SVZ-u hipoksijske skupine 8 sati nakon perinatalne hipoksije bilo prisutno manje Iba-1 reaktivnih stanica, s povećanim sadržajem proteina Iba-1 u citoplazmi i u neposrednoj izvanstaničnoj blizini stanice (slika 9B'), u usporedbi s kontrolnom skupinom (slika 9B). Kvalitativna analiza histoloških rezova obojenih metodom klasične IHC za detekciju biljega makrofaga pokazala je više makrofaga koji izražavaju CD68 u SVZ-u posebno u njenom dorzalno-lateralnom dijelu, unatoč ukupnoj nižoj gustoći stanica u SVZ-u 24 sata nakon perinatalne hipoksije u hipoksijskoj skupini (slika 9D') u usporedbi s kontrolnom (slika 9D). Kvalitativna analiza histoloških rezova obojenih IF metodom pokazala je da su Iba-1-pozitivne stanice naprednije diferencijacije 24 sata nakon perinatalne hipoksije, poprimivši morfologiju zrele mikroglije u CG-u (slika 9E, E') i u SVZ-u (slika 9G, G') u hipoksijskoj skupini u usporedbi s kontrolnom. Nije bilo razlike u morfologiji ameboidnih Iba-1-pozitivnih stanica u CC-u između dvije skupine (slika 9F, F'). Kvalitativnom analizom histoloških rezova otkrivena je akutna ozljeda procesa proliferacije u SVZ-u i posljedična blaga aktivacija mikroglialnih stanica u ovom modelu umjerene perinatalne hipoksije.





**Slika 9.** Histološki, IHC i IF prikaz SVZ-a, CG-a i CC-a štakorskog mozga 8 sati i 24 sata nakon perinatalne hipoksije i morfologija mikroglijalnih stanica koja potvrđuje zahvaćene proliferacijske zone i ograničenu aktivaciju mikroglijalnih stanica u hipoksijskih štakora. Slika objavljena u radu: Trnski i sur. 2022. (129). Prikazano je izrazito smanjenje gustoće stanica u proliferativnoj SVZ-i štakora iz hipoksijske skupine 8 sati nakon perinatalne hipoksije (A'), što je još izraženije nakon 24 sata (C') u usporedbi sa SVZ-om štakora iz kontrolne skupine (A, C). (B, B') Vidljivo je manje brojnih, ali više razgranatih mikroglijalnih stanica u SVZ-u hipoksijske skupine 8 sati nakon perinatalne hipoksije. (D, D') Nije vidljiva ozbiljna reaktivnost makrofaga u hipoksijskoj skupini u usporedbi s kontrolnom 24 sata nakon perinatalne hipoksije. (E – G') Prikaz promijenjene morfologije Iba-1-imunoreaktivne mikroglije u CG-u i SVZ-i, ali ne i u CC-u 24 sata nakon perinatalne hipoksije. CG i SVZ kontrolne skupine sadržavaju srednji (engl. intermediate) morfološki oblik mikroglije (E, G), dok je kod hipoksijske skupine mikroglija razvila razgranatu

*(engl. ramified) morfologiju [(E', G') strelice], što ukazuje na njihovo prerano sazrijevanje. (F, F') U CC-u ove stanice imaju istu, ameboidnu morfologiju, u obje skupine. Mjerka za slike (A, A', C, C') prikazana je na (C') te predstavlja 100  $\mu\text{m}$ ; mjerka za slike (B, B', D, D') prikazana je na slici (D') te predstavlja 50  $\mu\text{m}$ , mjerka za slike (E – G') prikazana je na slici (G') te predstavlja 25  $\mu\text{m}$ . Reprezentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.*

### **5.3. Kvalitativne i kvantitativne promjene PNN-ova u zreloj moždanoj kori cingularne vijuge i hipokampusu u mozgu štakora P105 nakon perinatalne hipoksije**

#### 5.3.1. Promjene u morfologiji, razmješčaju, broju i molekularnim sastavnicama PNN-ova u MCC-u i RSC-u uz normotipični perinatalni razvitak i nakon perinatalne hipoksije

Temeljita kvalitativna analiza histoloških rezova obojenih modifikacijom metode po Nisslu razotkrila je očuvanu citoarhitektoniku (slika 10a, c), pravilnu kortikalnu laminaciju i odsutnost vidljivih patoloških značajki (slika 10A – D). Detaljnija kvalitativna analiza histoloških rezova obojenih metodom klasične IHC i IF metodom za detekciju PNN-ova (slika 10A' – D') i PV neurona (slika 10A'' – D'') u poljima od interesa – MCC-u i RSC-u (slika 10a, c) otkrila je razlike u morfologiji PNN-ova i PV neurona između hipoksijske i kontrolne skupine. Te razlike bile su uočene i kod ženki i kod mužjaka.

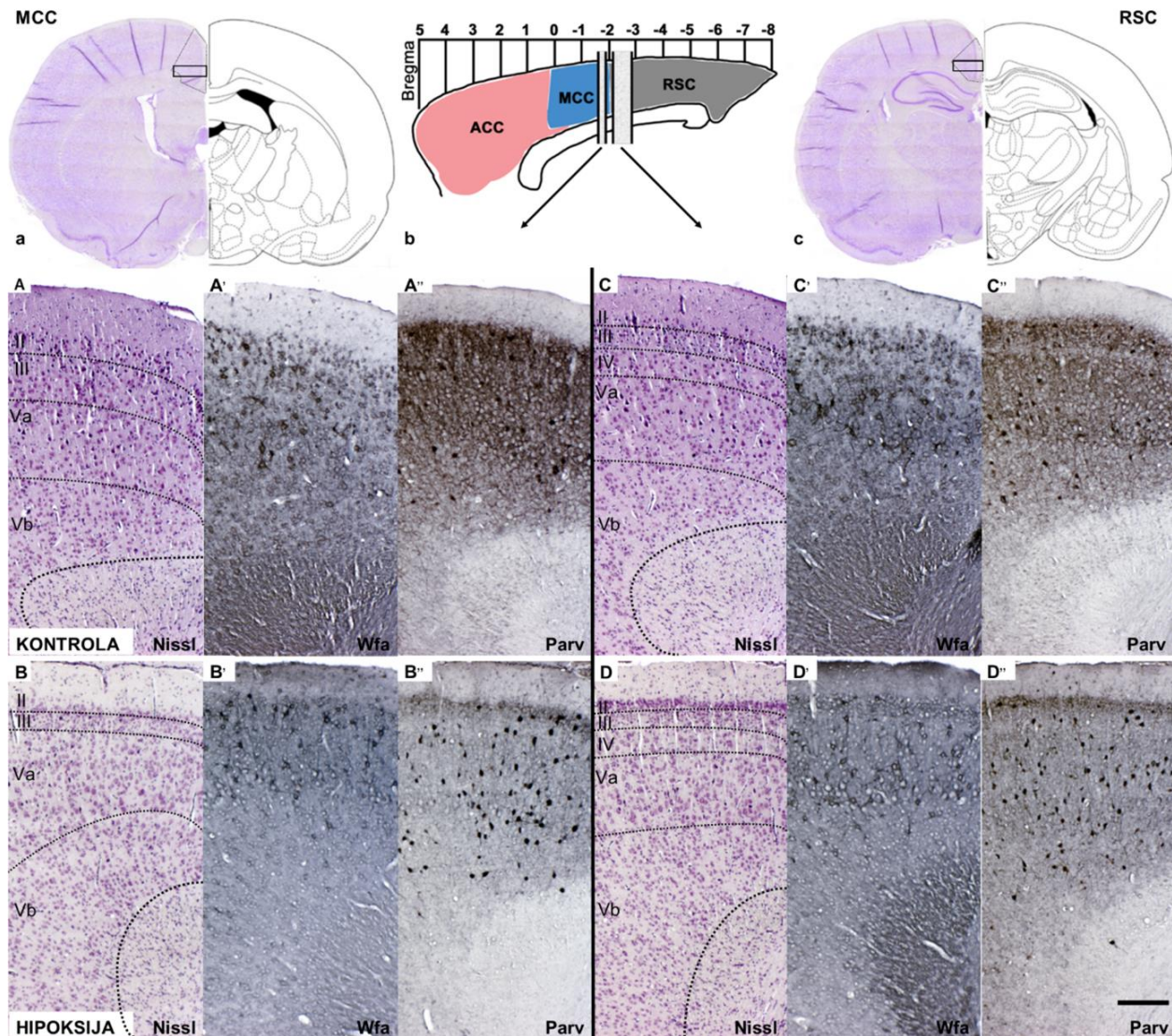
U kontrolnoj skupini PNN-ovi bili su slabije Wfa-pozitivni i prvenstveno su se nalazili oko tijela neurona i proksimalnih dendrita (slika 10A', C'; slika 11a, a'; slika 12A). U hipoksijskoj skupini bilo je vidljivo smanjenje difuznog Wfa-pozitivnog ECM-a s popratnim povećanim stvaranjem PNN-ova oko određene populacije neurona (slika 10B', D'). Morfologija pojedinačnih PNN-ova također je bila različita zbog intenzivnijeg Wfa obojenja oko tijela neurona te proksimalnih i bazalnih dendrita u hipoksijskoj skupini. Za razliku od štakora u kontrolnoj skupini, u štakora iz hipoksijske skupine često su i početni aksonski segmenti bili obuhvaćeni Wfa-pozitivnim perineuronskim mrežama (slika 11b, b'; slika 12B, strelica). U hipoksijskoj skupini PNN-ovi su bili brojniji i u MCC-u i u RSC-u, a osobito u slojevima II/III i V (slika 10A' – D'; slika 11a – b').

Najveći utjecaj perinatalne hipoksije bio je uočen u povećanju broja PNN-ova u MCC-u ( $p < 0,0001$ ; slika 13A) i u RSC-u ( $p = 0,0112$ ; slika 13E). Učinak perinatalne hipoksije na broj PNN-ova bio je uočen u oba spola (slika 13B, F).

U kontrolnoj skupini bila je vidljiva parvalbuminska imunoreaktivnost u tijelima interneurona te je bio izražen difuzni parvalbumin-pozitivni neuropil u slojevima II/III i V (slika 10A", C"; slika 11c, c'; slika 12A). U hipoksijskoj skupini bilo je vidljivo povećanje parvalbuminske imunoreaktivnosti u tijelima interneurona i u proksimalnom dijelu dendrita u slojevima III i V (slika 10B", D"; slika 11d, d', slika 12B). Također, bila je uočena jaka i dosljedno snižena regulacija neuropila pozitivnog na parvalbumin (slika 10B", D"; slika 11d, d').

Najznačajnija razlika između hipoksijske i kontrolne skupine bila je uočena u povećanju broja PV neurona u MCC-u ( $p < 0,0119$ ; slika 13C, D) i u RSC-u ( $p < 0,0012$ ; slika 13G, H). Učinak perinatalne hipoksije na broj PV neurona bio je značajan za oba spola.

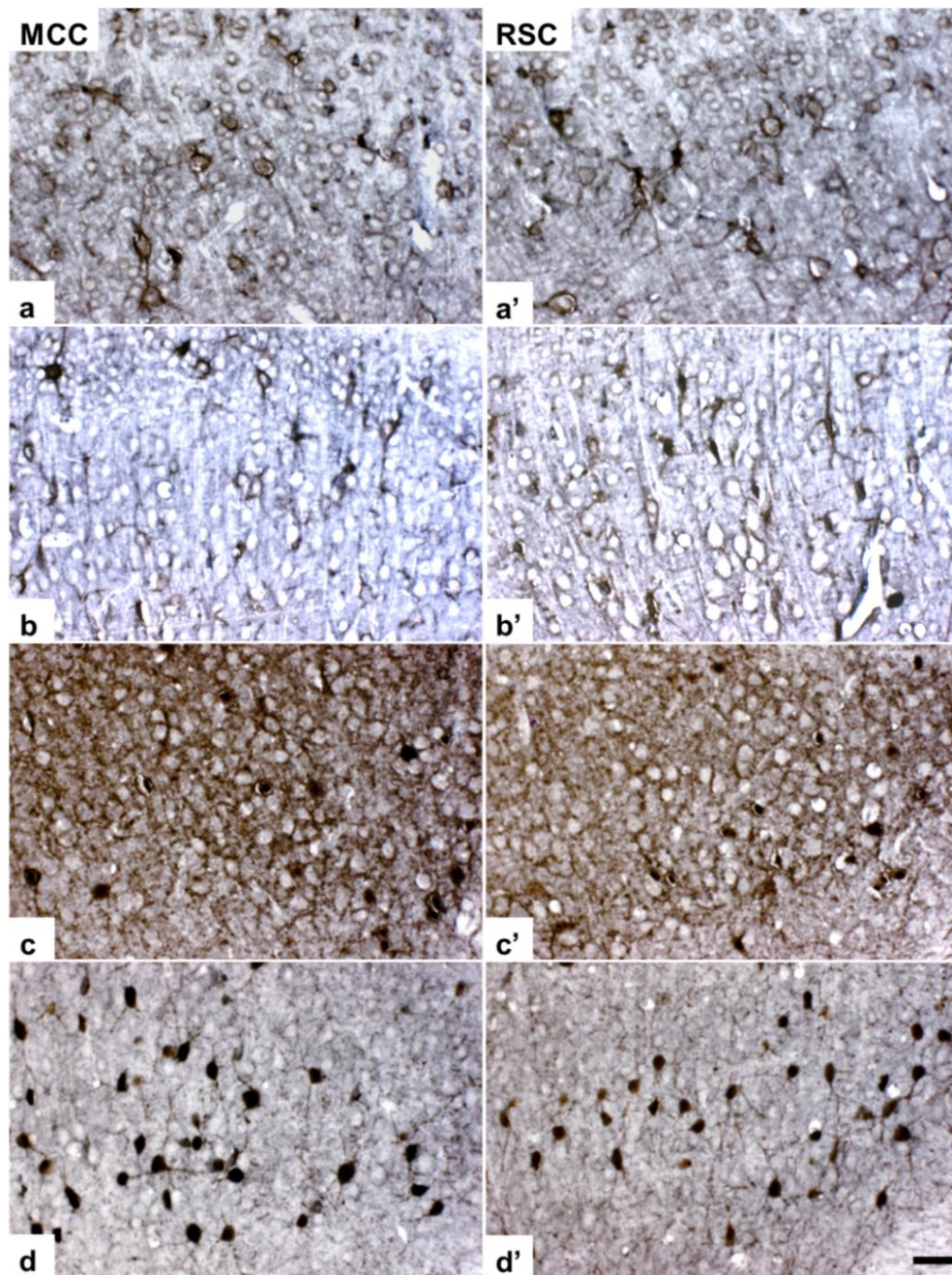




**Slika 10.** Prikaz zrelog CG-a štakorskog mozga 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije ukazuje na smanjenje difuznog Wfa-pozitivnog ECM-a i parvalbumin-pozitivnog neuropila te popratno povećano stvaranje PNN-ova oko određenih neurona i povećanje parvalbuminske imunoreaktivnosti u tijelima interneurona u hipoksijskoj skupini. Slika objavljena u radu: Trnski i sur. 2022. (129). (a) Koronarni presjek kroz veliki mozak na razini bregma - 1,56 mm obojen modifikacijom metode po Nisslu prikazuje polje MCC-a. Crni pravokutni okvir označava dio moždane kore prikazan u nastavku s većim povećanjem. (b) Shematski prikaz položaja područja CG-a i polja – ACC-a, MCC-a i RSC-a s obzirom na razinu prema bregmi i položaj iz kojeg su izolirani donji prikazani dijelovi. (c) Koronarni presjek kroz veliki mozak na razini bregma - 2,76 mm obojen modifikacijom metode po Nisslu prikazuje polje RSC-a. Crni pravokutni okvir označava

dio moždane kore prikazan u nastavku s većim povećanjem. (A – D) Očuvana je citoarhitektonika i kortikalna laminacija u MCC-u i RSC-u u kontrolnoj i hipoksijskoj skupini. (A' – D') Vidljive su razlike u kvalitativnim karakteristikama ECM-a gdje je Wfa-pozitivni ECM difuzno prisutan u svim kortikalnim slojevima i u obliku PNN-ova oko određenih neurona pretežno u kortikalnim slojevima III i V u kontrolnoj skupini. Nasuprot tome, u hipoksijskoj skupini, Wfa-pozitivni ECM lokaliziran je gotovo isključivo u obliku PNN-ova. PNN-ovi su najčešće oko interneurona u slojevima II/III, a još više u sloju V, što je posebno izraženo u RSC-u. (A'' – D'') Vidljiva je smanjena izražajnost difuznog parvalbumina u kortikalnom neuropilu štakora podvrgnutih perinatalnoj hipoksiji. Međutim, tijela interneurona pozitivna na parvalbumin posebno su izraženija u kortikalnim slojevima II/III i V hipoksijske skupine. U kontrolnoj skupini parvalbumin-pozitivni cingularni neuropil izražen je u kortikalnim slojevima II/III i V, ali s manjim intenzitetom izražaja parvalbumina u tijelima interneurona. Mjerka za slike (A – D'') prikazana je na slici (D''), a predstavlja 200  $\mu\text{m}$ . Reprezentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.

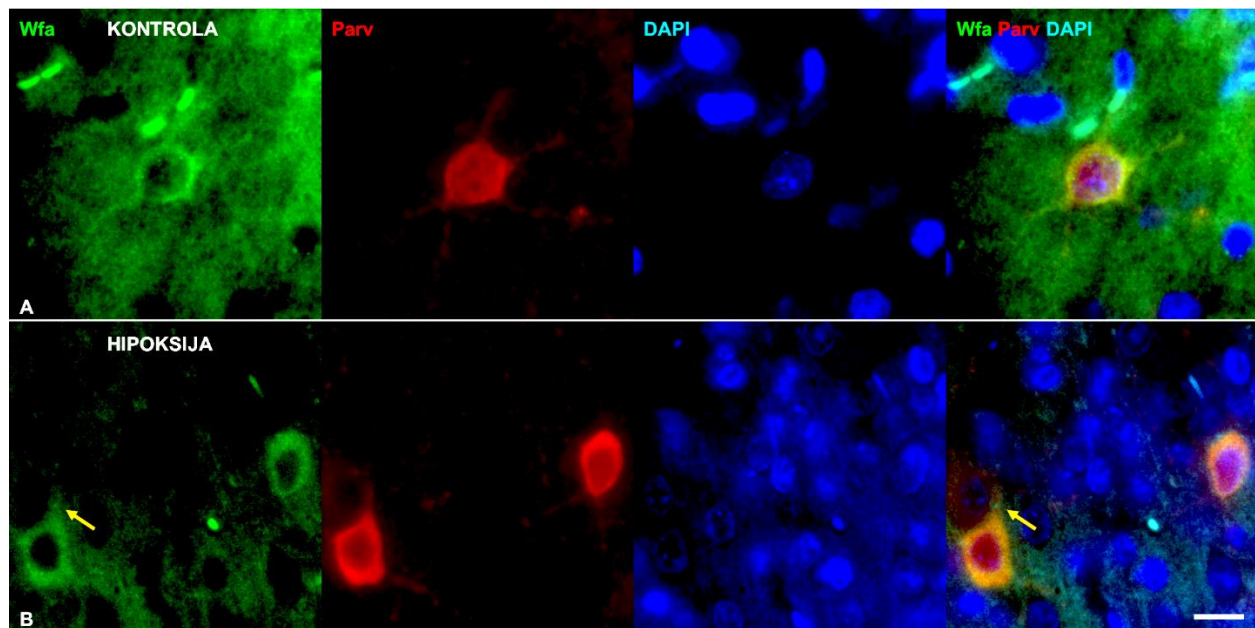




**a; a'**=kontrola Wfa; **b; b'**=hipoksija Wfa;  
**c; c'**=kontrola Parv; **d; d'**=hipoksija Parv

**Slika 11.** Prikaz zrelog CG-a štakorskog mozga i kvalitativne razlike PNN-ova i PV neurona koje potvrđuju trajnu strukturnu promjenu u povezanosti CG-a između kontrolne i hipoksijske skupine 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. Slika objavljena u radu: Trnski i sur. 2022. (129). (a – b) Veliko povećanje kortikalnih slojeva III-Va u MCC-u (a, b) i kortikalnih slojeva III-Va u RSC-

u (a', b') prikazuje PNN-ove intenzivnijeg Wfa-obojenja oko tijela neurona i proksimalnog dijela dendrita nakon perinatalne hipoksije (b, b') u usporedbi s kontrolnom skupinom (a, a'). (c – d') Veliko povećanje kortikalnih slojeva III-Va u MCC-u (c, c') i kortikalnih slojeva III-Va u RSC-u (d, d') prikazuje PV neurone čija su tijela izrazito snažno imunoreaktivna na parvalbumin kao i proksimalni dio dendrita u štakora podvrgnutih perinatalnoj hipoksiji (d, d') u usporedbi s kontrolnom skupinom (c, c'). Mjerka za slike (a – d') prikazana je na slici (d'), a predstavlja 50  $\mu$ m. Reprezentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.



**Slika 12.** Prikaz kolokalizacije PNN-ova i PV neurona pod velikim povećanjem u zrelom MCC-u štakorskog mozga 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. Slika objavljena u radu: Trnski i sur. 2022. (129). (A) Reprezentativna perineuronska mreža (Wfa, zeleno) u kontrolnoj skupini vidljiva je oko staničnog tijela PV neurona (Parv, crveno) kao tanak sloj. Stanično tijelo parvalbumin-pozitivnog interneurona u kontrolnoj skupini je veće u usporedbi sa staničnim tijelom PV neurona u hipoksijskoj skupini. (B) Reprezentativni PNN-ovi (Wfa, zeleno) u hipoksijskoj skupini pokazuju intenzivnije Wfa-obojenje što govori o kondenziranosti ECM-a oko tijela neurona, proksimalnog dijela dendrita, a često i početnog segmenta aksona [(B); strelice]. PV neuroni (Parv, crveno) imaju manja tijela neurona u hipoksijskoj skupini u usporedbi s kontrolnom. Nema razlike u nuklearnom bojenju (DAPI, plavo) između kontrolne (A) i hipoksijske (B) skupine. Mjerka za slike

*(A – B) prikazana je na slici (B), a predstavlja 25  $\mu\text{m}$ . Reprezentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.*

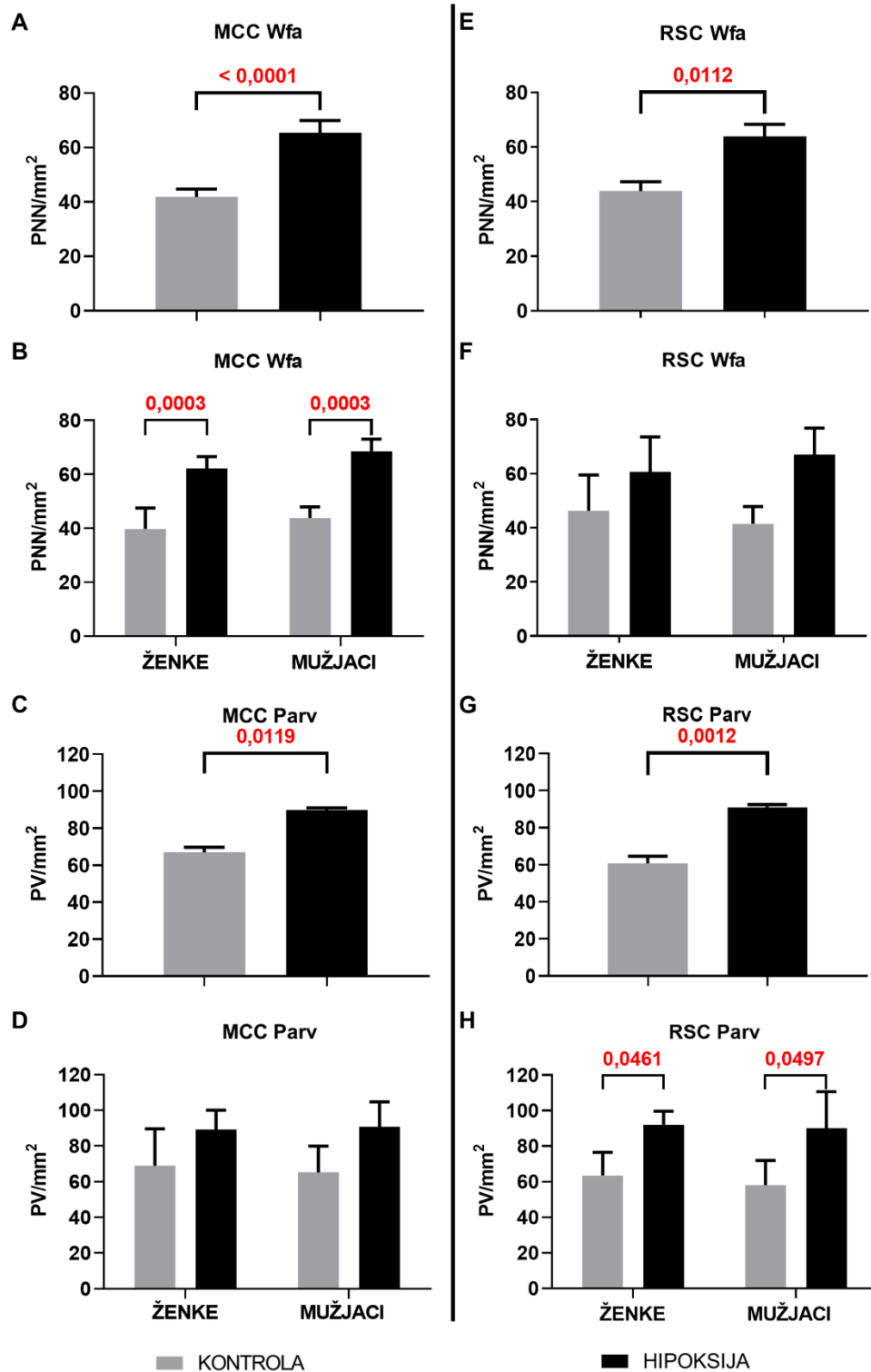
Kvantitativna analiza provedena nezavisnom dvosmjernom analizom varijance pokazala je značajan utjecaj perinatalne hipoksije na broj PNN/ $\text{mm}^2$  u MCC-u (slika 13A) (Hipoksija =  $F(1,12) = 72,46$ ;  $p < 0,0001$ ; Spol =  $F(1,12) = 3,64$ ;  $p = 0,08$ ; Interakcija =  $F(1,12) = 0,19$ ;  $p = 0,67$ ) i u RSC-u (slika 13E) (Hipoksija =  $F(1,9) = 10,11$ ;  $p = 0,01$ ; Spol =  $F(1,9) = 0,02$ ;  $p = 0,91$ ; Interakcija =  $F(1,9) = 0,78$ ;  $p = 0,40$ ).

Hipoksijske ženke i mužjaci imali su značajno veći broj PNN/ $\text{mm}^2$  u MCC-u (slika 13B) ( $p\check{Z}ENKE = 0,0003$ ;  $pMU\check{Z}JACI = 0,0003$ ), dok je u RSC-u (slika 13F) bio vidljiv isti trend, ali razlika nije bila značajna ( $p\check{Z}ENKE = 0,39$ ;  $pMU\check{Z}JACI = 0,08$ ).

Također, bio je vidljiv i značajan utjecaj perinatalne hipoksije na broj PV/ $\text{mm}^2$  u MCC-u (slika 13C) (Hipoksija =  $F(1,12) = 8,77$ ;  $p = 0,01$ ; Spol =  $F(1,12) = 0,02$ ;  $p = 0,89$ ; Interakcija =  $F(1,12) = 0,11$ ;  $p = 0,74$ ) i u RSC-u (slika 13G) (Hipoksija =  $F(1,12) = 17,84$ ;  $p = 0,0012$ ; Spol =  $F(1,12) = 0,28$ ;  $p = 0,61$ ; Interakcija =  $F(1,12) = 0,06$ ;  $p = 0,81$ ).

Hipoksijske ženke i mužjaci imali su značajno veći broj PV/ $\text{mm}^2$  u RSC-u (slika 13H) ( $p\check{Z}ENKE = 0,05$ ;  $pMU\check{Z}JACI = 0,05$ ), dok u MCC-u (slika 13D) ta razlika nije bila statistički značajna ( $p\check{Z}ENKE = 0,25$ ;  $pMU\check{Z}JACI = 0,18$ ).





**Slika 13.** Kvantitativne razlike u broju PNN/mm<sup>2</sup> i PV/mm<sup>2</sup> u MCC-u i RSC-u između kontrolne i hipoksijske skupine 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. Grafički prikaz objavljen u radu:

*Trnski i sur. 2022. (129). Kvantitativni rezultati pokazuju da je učinak hipoksije prisutan u oba polja od interesa: hipoksijska skupina ima značajno veći broj PNN-ova po jedinici površine u MCC-u (A) i RSC-u (E) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Također, hipoksijska skupina ima značajno veći broj PV neurona po jedinici površine u MCC-u (C) i RSC-u (G) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Uspoređujući štakore oba spola, hipoksijske ženke i hipoksijski mužjaci imaju značajno veći broj PNN/mm<sup>2</sup> od kontrolnih ženki i mužjaka u MCC-u (B), dok je u RSC-u (F) vidljiv isti trend, ali razlika nije značajna. Utjecaj perinatalne hipoksije na spol također je vidljiv i u povećanju broja PV/mm<sup>2</sup>, gdje hipoksijske ženke i mužjaci imaju značajno veći broj PV/mm<sup>2</sup> od kontrolnih ženki i mužjaka u RSC-u (H), dok je u MCC-u (D) sklonost ovog učinka vidljiva, ali razlika nije statistički značajna. Unutar kontrolne skupine nisu uočene statistički značajne spolne razlike u ovim parametrima. Vrijednosti na grafikonima prikazane su kao srednja vrijednost ± SD od 7 – 9 životinja po skupini, odnosno 4 – 5 ženki i 3 – 4 mužjaka.*

Nakon utvrđenih razlika u morfologiji i broju PNN-ova i PV neurona između hipoksijske i kontrolne skupine 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije, provedena je detaljnija kvalitativna analiza IF metodom dvostrukog obilježavanja za detekciju molekularnih sastavnica PNN-ova – agrekana, neurokana, versikana i njihove kolokalizacije s PV neuronima te kolokalizacije PNN-ova oko NeuN-a, PV neurona i somatostatina u MCC-u.

Nissl bojenjem utvrđena je očuvana citoarhitektonika i kortikalna laminacija u MCC-u (slika 14A) u kontrolnoj (slika 14B) i hipoksijskoj (slika 14C) skupini 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije.

Agrekan je, kao sastavnica PNN-ova, bio izražen i u kontrolnoj (slika 15B) i u hipoksijskoj (slika 15E) skupini u svim slojevima MCC-a, ali je u hipoksijskoj skupini bio višeg intenziteta izražaja u sloju I te je bio gušće raspoređen u slojevima II i III nego u kontrolnoj skupini.

Bilo je vidljivo da su PV neuroni višeg intenziteta izražaja u hipoksijskoj skupini, tijela interneurona bila su izrazito snažno imunoreaktivna na parvalbumin te su bili gušće raspoređeni u slojevima II, III, Va i Vb (slika 15D; 16D; 17D; 19E) u usporedbi s kontrolnom skupinom (slika 15A; 16A; 17A; 19B). Posljedično, stupanj kolokalizacije agrekana oko PV neurona u kontrolnoj i hipoksijskoj skupini bio je jednak (100 %) jer je u obje skupine kondenzirani agrekan izražen oko PV neurona. Međutim, u kontrolnoj skupini broj PV neurona bio je manji pa je ukupno bilo manje stanica koje izražavaju i agrekan i PV neurone te su najviše bile vidljive u slojevima II i III, a vrlo

malo u sloju Va (slika 15C). U hipoksijskoj skupini, zbog većeg broja PV neurona, kolokalizacija je bila izraženija u slojevima II, III, Va i Vb (slika 15F).

Neurokan je, kao sastavnica PNN-ova, u kontrolnoj skupini bio izražen u slojevima II, III i Va, a najviše u sloju Va te je bio kondenzirane, nježne mrežaste strukture (slika 16B). U hipoksijskoj skupini također je bilo vidljivo kondenziranije nakupljanje neurokana u obliku mrežaste strukture u slojevima II, III, Va i Vb, ali je neurokan bio prisutan u značajnoj mjeri i u difuznom obliku (slika 16E). Kondenzirani neurokan i u kontrolnoj i u hipoksijskoj skupini nalazio se dominantno oko PV neurona, ali valja naglasiti da se i oko dijela PV neurona nije nalazio kondenzirani neurokanski ECM. U kontrolnoj skupini kolokalizacija neurokana oko PV neurona bila je vidljiva prvenstveno u sloju Va (slika 16C), dok je u hipoksijskoj skupini bila jasno vidljiva u slojevima Va i Vb (slika 16F).

Versikan je, kao sastavnica PNN-ova, u kontrolnoj skupini bio izražen u slojevima I, II, III, Va i Vb, a najviše u slojevima II, III, Va (slika 17B) te je bio kondenzirane strukture. U hipoksijskoj skupini također je kondenzirani versikan bio izražen u slojevima I, II, III, Va i Vb (slika 17E), ali u sloju Va bio je vidljiv veći izražaj versikana nego u kontrolnoj skupini u sloju Va. Vrlo malo kondenziranog versikana nalazilo se oko PV neurona, dok se u većoj mjeri kondenzirani versikanski ECM nije nalazio oko PV neurona. Kolokalizacija versikana oko PV neurona bila je vidljiva u slojevima II, III i Va bez vidljivih razlika između kontrolne (slika 17C) i hipoksijske skupine (slika 17F).

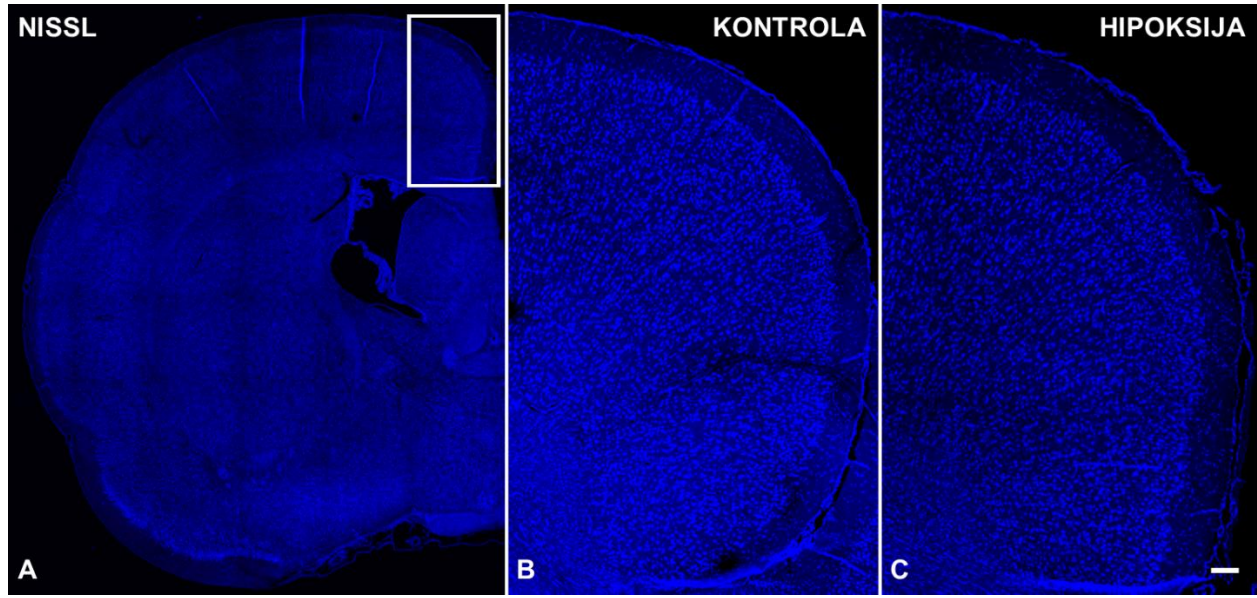
Wfa je pokazao mrežastu strukturu PNN-ova u kontrolnoj skupini u slojevima II, III i Va (slika 18A; 19A; 20A) te su PNN-ovi bili gušće zbijeni i razgranatiji u sloju Va. U hipoksijskoj skupini mrežasti, kondenziraniji, izraženiji i brojniji PNN-ovi bili su prisutni jednakomjerno u slojevima II, III, Va i Vb (slika 18D; 19D; 20D).

Opći biljeg kortikalnih neurona, NeuN, bio je prisutan u svim slojevima MCC-a u kontrolnoj (slika 18B) i hipoksijskoj skupini (slika 18E). U kontrolnoj skupini postojala je jasna distinkcija između slojeva te je sloj II/III bio izraženiji negoli u hipoksijskoj skupini gdje se izgubila zbijenost neurona u sloju II/III i jasna laminacija. U kontrolnoj skupini broj PNN-ova bio je manji pa je ukupno bilo manje stanica koje izražavaju i PNN-ove i NeuN-pozitivne neurone te su najviše bile vidljive u slojevima III i Va (slika 18C). U hipoksijskoj skupini, zbog većeg broja PNN-ova, kolokalizacija

kondenziranog ECM-a u obliku PNN-ova oko NeuN-pozitivnih neurona bila je vidljiva u slojevima II, III, Va i Vb (slika 18F). Također, bilo je vidljivo da se svi PNN-ovi u hipoksijskoj skupini nalaze oko NeuN-pozitivnih neurona, dok je u kontrolnoj skupini bilo PNN-ova koji se ne nalaze oko NeuN-pozitivnih neurona u sloju Va.

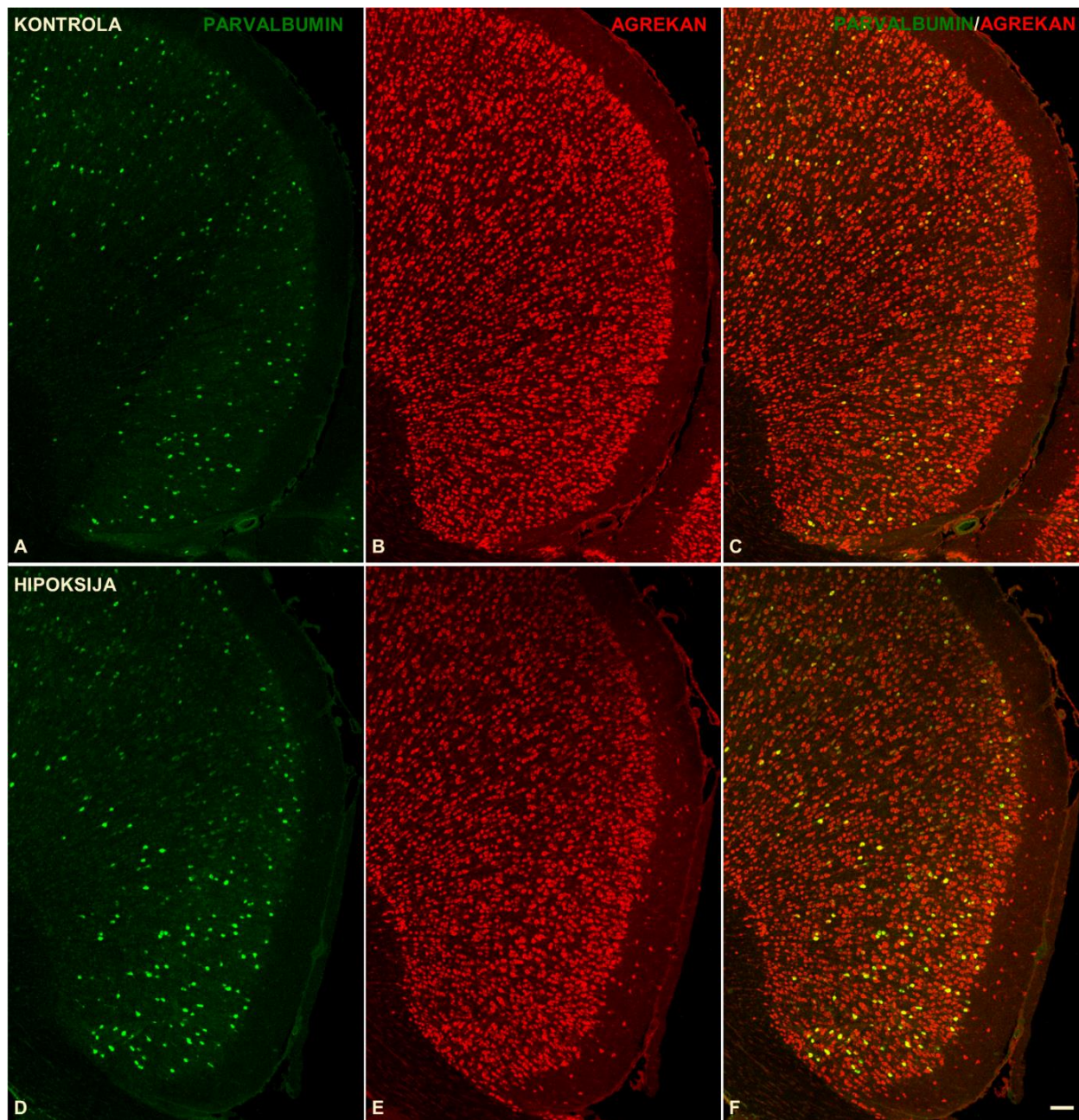
U kontrolnoj skupini broj PNN-ova i PV neurona bio je manji pa je ukupno bilo manje stanica koje izražavaju i PNN-ove i PV neurone te su najviše bile vidljive u slojevima II, III i Va (slika 19C). U hipoksijskoj skupini, zbog većeg broja PNN-ova i PV neurona, kondenzirani ECM u obliku PNN-ova nalazio se oko PV neurona u slojevima II, III, Va i Vb (slika 19F). Isto tako bilo je vidljivo da se svaka perineuronska mreža nalazila oko PV neurona u kontrolnoj skupini osim u sloju Vb, dok su u hipoksijskoj skupini bili prisutni PNN-ovi koje se nisu nalazili oko PV neurona u slojevima II, III, Va i Vb.

Osim parvalbumina, bio je analiziran još jedan biljeg interneurona – somatostatin. Somatostatin-pozitivni interneuroni bili su prisutni u slojevima II, III, Va i Vb, ali najviše u sloju Va u kontrolnoj skupini (slika 20B). U hipoksijskoj skupini somatostatin-pozitivni interneuroni bili su brojniji i jednakomjerno raspoređeni u slojevima II, III, Va i Vb (slika 20E). Nakupljanje kondenziranog ECM-a u obliku PNN-ova oko somatostatin-pozitivnih interneurona nije bilo vidljivo ni u kontrolnoj (slika 20C) ni u hipoksijskoj skupini (slika 20F).



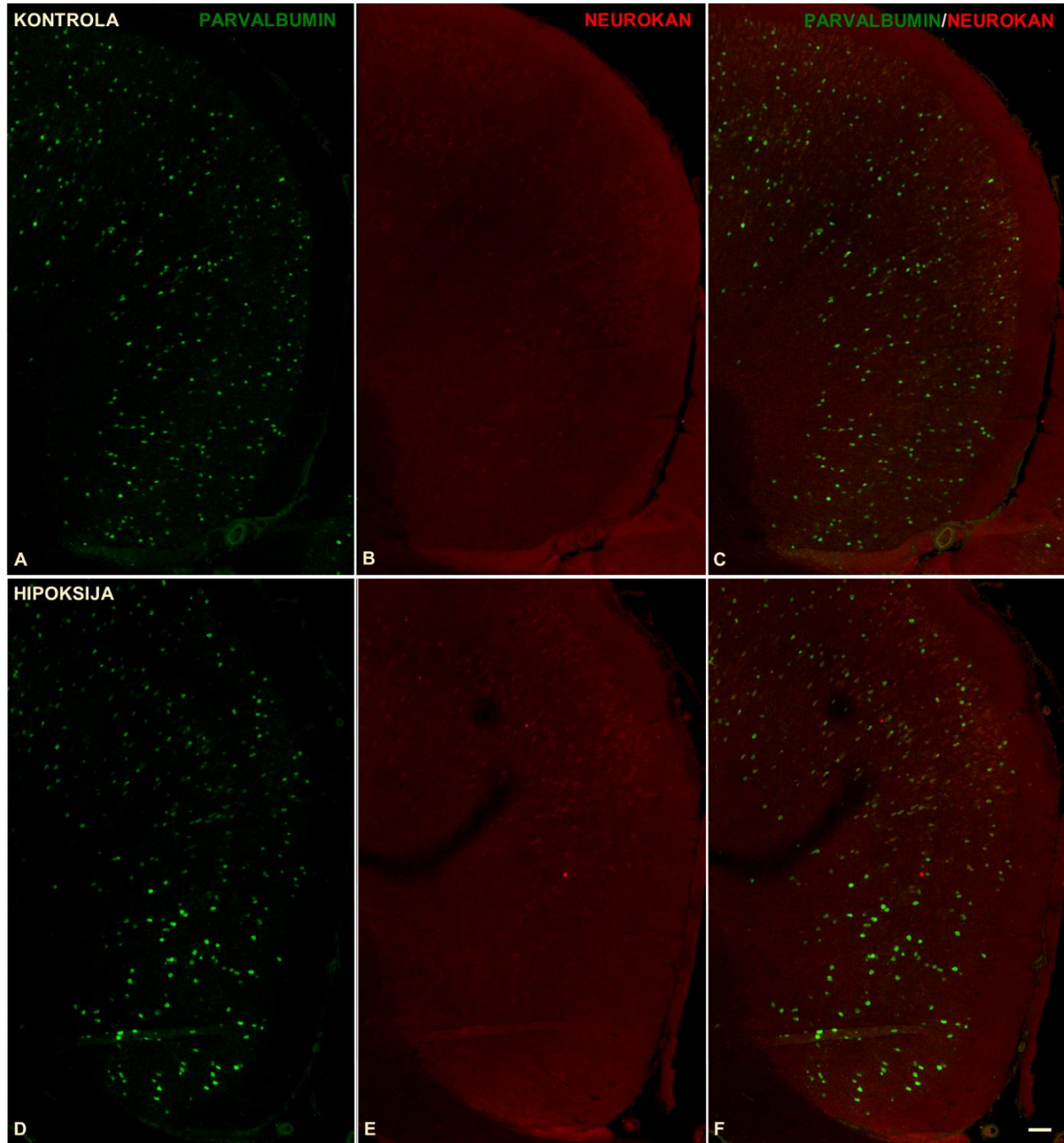
**Slika 14.** Prikaz zrelog MCC-a štakorskog mozga 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije Nissl bojenjem. (A) Koronarni presjek kroz veliki mozak na razini bregma - 1,56 mm obojen Nissl bojenjem prikazuje polje MCC-a. Bijeli pravokutni okvir označava dio moždane kore prikazan u nastavku s većim povećanjem. Prikazana je očuvana citoarhitektonika i kortikalna laminacija u kontrolnoj (B) i hipoksijskoj skupini (C). Mjerka za slike (B, C) prikazana je na slici (C), a predstavlja 400  $\mu\text{m}$ . Reprezentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.





**Slika 15.** Prikaz izražaja agrekana, kao sastavnice PNN-ova, i njegove kolokalizacije s PV neuronima u zrelom MCC-u štakorskog mozga 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. (A) U kontrolnoj skupini u slojevima II – V PV neuroni su manjeg intenziteta izražaja u usporedbi s hipoksijskom skupinom (D) gdje su tijela interneurona izrazito snažno imunoreaktivna na parvalbumin. Agrekan je izražen u slojevima I – V i u kontrolnoj (B) i u hipoksijskoj skupini (E), ali je višeg intenziteta izražaja u sloju I te je gušće raspoređen u slojevima II i III u hipoksijskoj nego u kontrolnoj skupini. (C) U kontrolnoj skupini broj PV neurona je manji pa ukupno ima manje

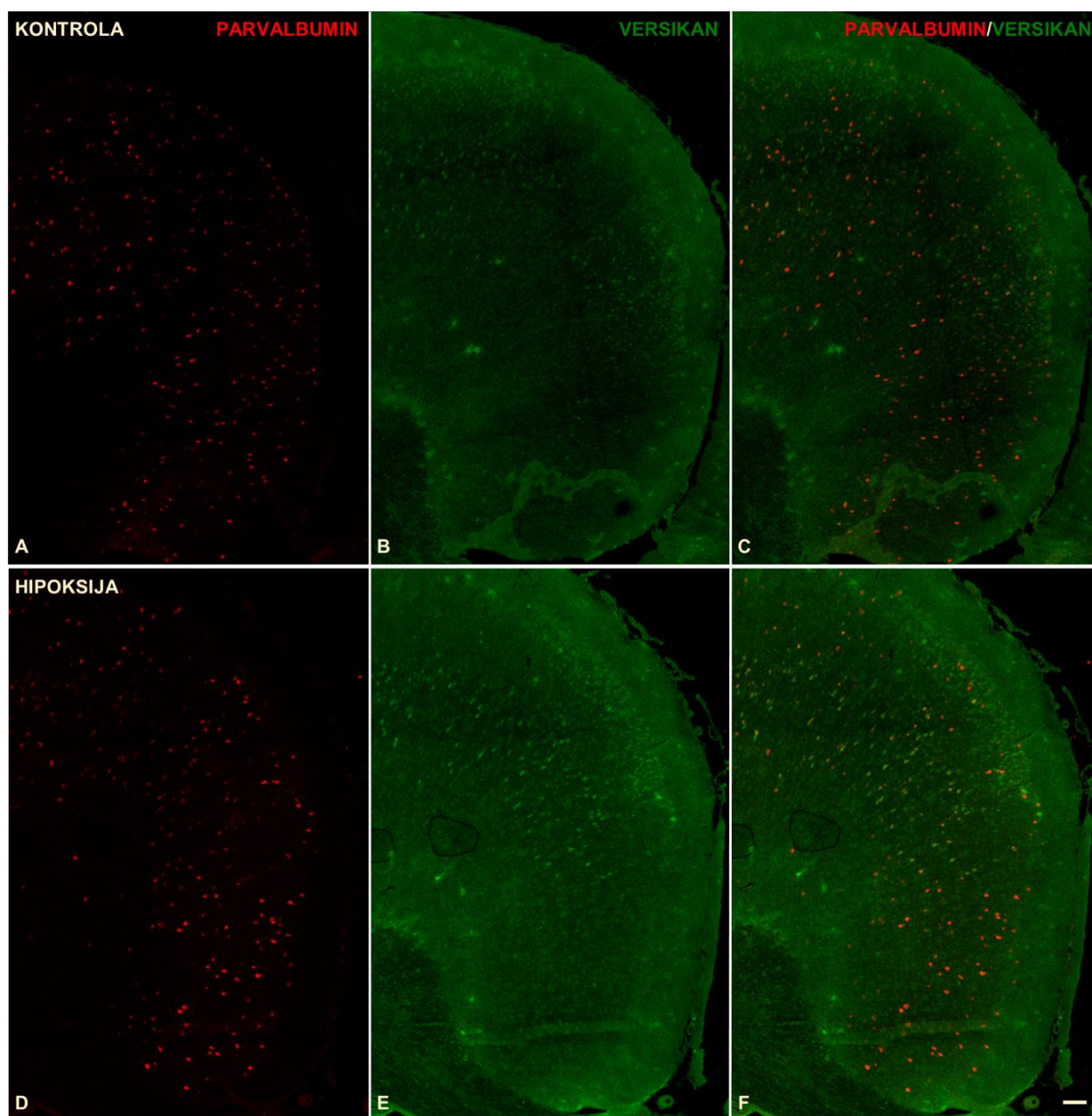
*stanica koje izražavaju i agrekan i PV neurone te su najviše vidljive u slojevima II i III, a vrlo malo u sloju Va. (F) U hipoksijskoj skupini, zbog većeg broja PV neurona, kolokalizacija je izraženija u slojevima II, III, Va i Vb. Mjerka za slike (A – F) prikazana je na slici (F), a predstavlja 400  $\mu$ m. Reprezentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.*



**Slika 16.** Prikaz izražaja neurokana, kao sastavnice PNN-ova, i njegove kolokalizacije s PV neuronima u zrelom MCC-u štakorskog mozga 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. (B) Neurokan je u kontrolnoj skupini izražen u slojevima II – V, a najviše u sloju Va te je kondenzirane, nježne mrežaste strukture u usporedbi s hipoksijskom skupinom (E) gdje je kondenziranije nakupljanje neurokana u slojevima II – V, ali je neurokan prisutan u značajnoj mjeri i u difuznom obliku. U kontrolnoj skupini nakupljanje kondenziranog neurokana oko PV neurona vidljivo je

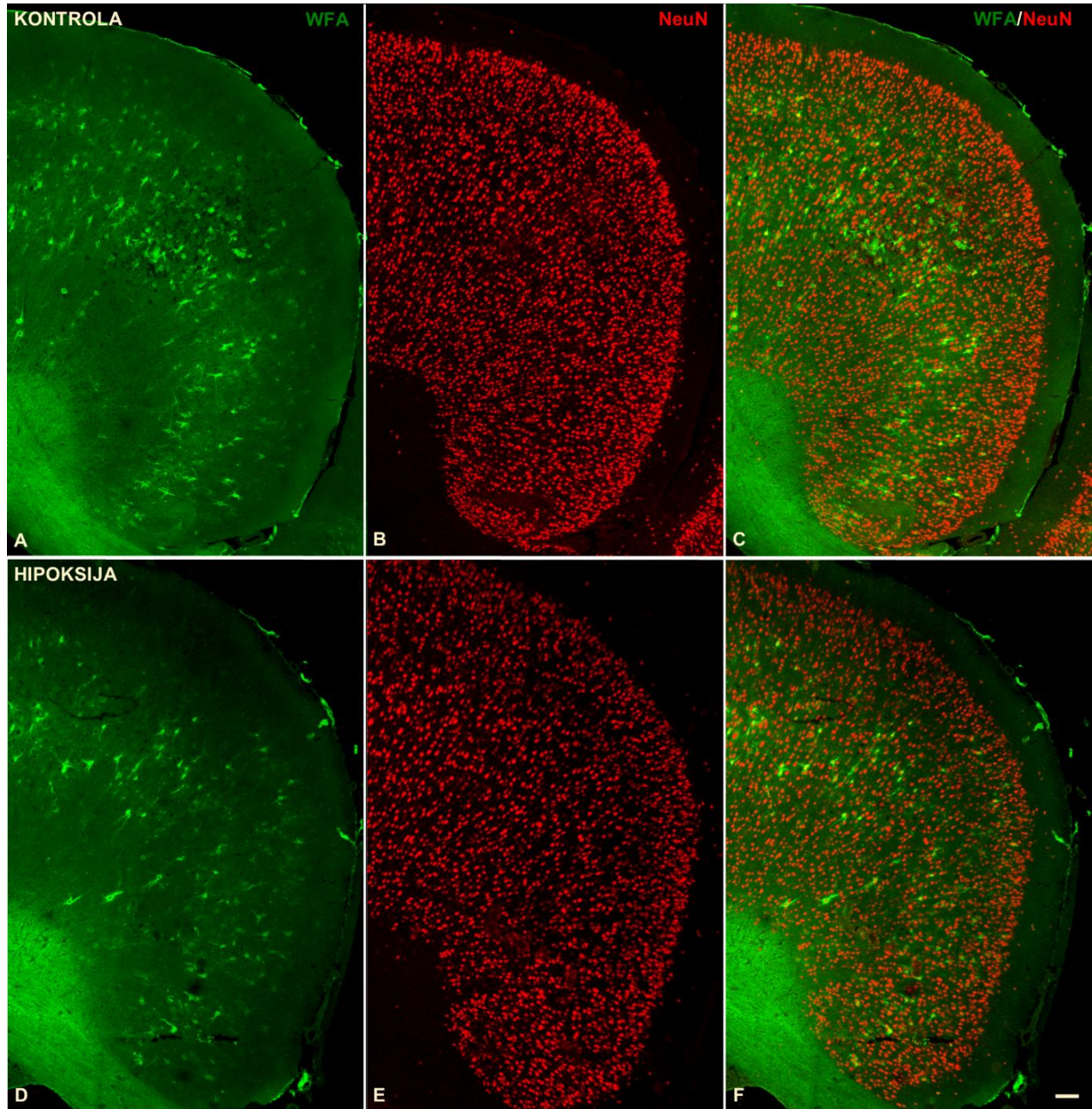


prvenstveno u sloju Va (C) dok je u hipoksijskoj skupini jasno vidljiva u slojevima Va i Vb (F), što je očekivano obzirom da je kondenziraniji neurokan izraženiji u hipoksijskoj skupini, a izražaj PV neurona u slojevima II – V je višeg intenziteta (D) nego u kontrolnoj skupini (A). Mjerka za slike (A – F) prikazana je na slici (F), a predstavlja 400  $\mu$ m. Reprezentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.



**Slika 17.** Prikaz izražaja versikana, kao sastavnice PNN-ova, i njegove kolokalizacije s PV neuronima u zrelom MCC-u štakorskog mozga 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. (B)

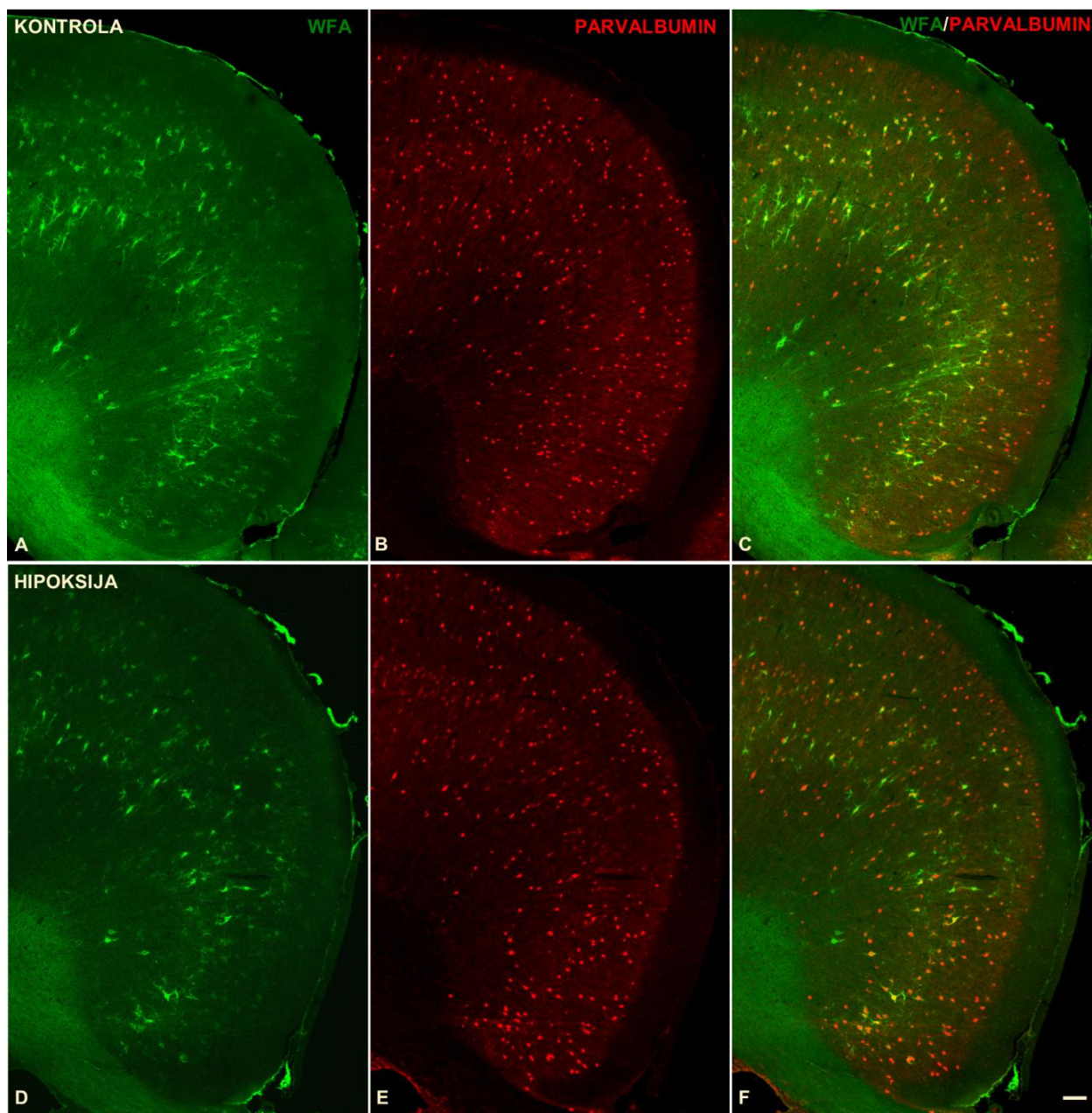
*Versikan je u kontrolnoj skupini izražen najviše u slojevima II, III, Va, dok je u hipoksijskoj skupini (E) u sloju Va višeg intenziteta izražaja. Vrlo malo kondenziranog versikana nalazi se oko PV neurona te nema vidljivih razlika između kontrolne (C) i hipoksijske skupine (F), iako je vidljiv izražaj višeg intenziteta PV neurona u slojevima II – V u hipoksijskoj (D) nego u kontrolnoj skupini (A). Mjerka za slike (A – F) prikazana je na slici (F), a predstavlja 400  $\mu\text{m}$ . Repräsentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.*



**Slika 18.** Prikaz izražaja PNN-ova i njihove kolokalizacije s NeuN-pozitivnim neuronima u zrelom MCC-u štakorskog mozga 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. (A) U kontrolnoj skupini u slojevima II – V PNN-ovi su manjeg intenziteta izražaja, ali su gušće zbijeni i razgranatiji u sloju Va u usporedbi s hipoksijskom skupinom (D) gdje su kondenziraniji, izraženiji i brojniji te jednakomjerno prisutni u slojevima II – V. NeuN-pozitivni neuroni izraženi su u slojevima II – V i u kontrolnoj (B) i u hipoksijskoj skupini (E), ali je prisutna jasna laminacija i izraženiji sloj II/III u kontrolnoj u usporedbi s hipoksijskom skupinom. (C) U kontrolnoj skupini broj PNN-ova je manji

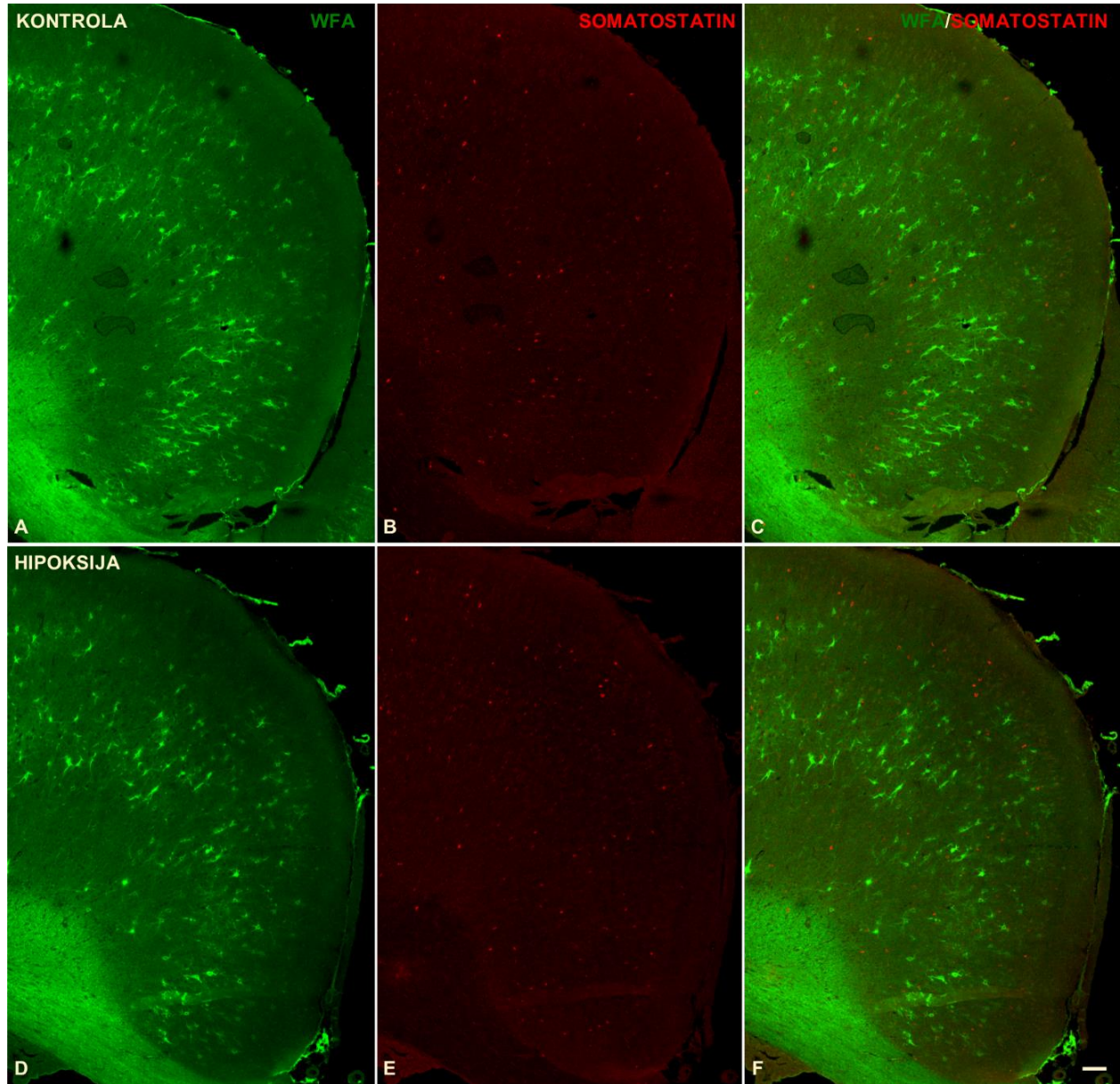


pa ukupno ima manje stanica koje izražavaju i PNN-ove i NeuN-pozitivne neurone te su najviše vidljive u slojevima III i Va, dok u hipoksijskoj skupini, zbog većeg broja PNN-ova, kolokalizacija PNN-ova oko NeuN-pozitivnih neurona je vidljiva u slojevima II – V (F). Mjerka za slike (A – F) prikazana je na slici (F), a predstavlja 400  $\mu$ m. Reprezentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.



**Slika 19.** Prikaz izražaja PNN-ova i njihove kolokalizacije s PV neuronima u zrelom MCC-u štakorskog mozga 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. (B) U kontrolnoj skupini u slojevima

*II – V PV neuroni su manjeg intenziteta izražaja u usporedbi s hipoksijskom skupinom (E) gdje su tijela interneurona izrazito snažno imunoreaktivna na parvalbumin. (C) U kontrolnoj skupini broj PNN-ova i PV neurona je manji pa ukupno ima manje stanica koje izražavaju i PNN-ove i PV neurone. (F) U hipoksijskoj skupini PNN-ovi se nalaze oko PV neurona u slojevima II – V, što je očekivano obzirom da su PNN-ovi izraženiji u slojevima II – V, kondenziraniji, izraženiji i brojniji u hipoksijskoj skupini (D), dok su u kontrolnoj manjeg intenziteta izražaja (A). Mjerka za slike (A – F) prikazana je na slici (F), a predstavlja 400  $\mu$ m. Reprezentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.*



**Slika 20.** Prikaz dvostruko obilježenog reza koji prikazuje izražaj PNN-ova (WFA) i somatostatin-pozitivnih interneurona u zrelom MCC-u štakorskog mozga 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. (B) U kontrolnoj skupini somatostatin-pozitivni interneuroni najviše su prisutni u sloju Va, dok su u hipoksijskoj skupini (E) brojniji i jednakomjerno raspoređeni u slojevima II – V. (C) Nakupljanje kondenziranog ECM-a u obliku PNN-ova oko somatostatin-pozitivnih interneurona nije prisutno niti u kontrolnoj (C) niti u hipoksijskoj skupini (F), premda su PNN-ovi izraženi u slojevima II – V, ali manjeg intenziteta izražaja u kontrolnoj (A) nego u hipoksijskoj skupini (D).

*Mjerka za slike (A – F) prikazana je na slici (F), a predstavlja 400 µm. Repräsentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.*

### 5.3.2. Promjene u morfologiji, razmještaju, broju i molekularnim sastavnicama PNN-ova u hipokampusu uz normotipični perinatalni razvitak i nakon perinatalne hipoksije

Temeljita kvalitativna analiza histoloških rezova obojenih modifikacijom metode po Nisslu razotkrila je očuvanu citoarhitektoniku (slika 21a), pravilnu laminaciju svih slojeva u poljima CA1, CA2 i CA3 i u GD-u te odsutnost vidljivih patoloških značajki (slika 21A, A'). Detaljnija kvalitativna analiza histoloških rezova obojenih metodom klasične IHC za detekciju PNN-ova (slika 21B, B') i PV neurona (slika 21C, C') u hipokampusu (slika 21a) otkrila je razlike u morfologiji i razmještaju prema slojevima u poljima CA1, CA2, CA3 i u GD-u između hipoksijske i kontrolne skupine. Te razlike bile su uočene i kod ženki i kod mužjaka.

U hipoksijskoj skupini bili su prisutni brojniji PNN-ovi s intenzivnijim Wfa-obojeanjem oko tijela neurona, dok su u kontrolnoj skupini bili prisutni malobrojniji, slabije Wfa-pozitivni PNN-ovi koji tvore nježni, mrežasti omotač (slika 21B, B').

U polju CA1 u sloju, stratum oriens (Or) bili su prisutni Wfa-pozitivni PNN-ovi oko tijela neurona u hipoksijskoj skupini dok u kontrolnoj nisu bili prisutni. U slojevima, stratum pyramidale (Py) i stratum radiatum (Rad) bilo je prisutno više i jače kondenziranih Wfa-pozitivnih PNN-ova u hipoksijskoj skupini nego u kontrolnoj. U sloju, stratum lacunosum moleculare (LMol) bila je vidljiva najveća razlika u broju i morfologiji PNN-ova između hipoksijske i kontrolne skupine, gdje su PNN-ovi bili brojniji s intenzivnijim Wfa-obojeanjem u hipoksijskoj skupini, dok su u kontrolnoj skupini bili malobrojniji, slabije Wfa-pozitivni i tvore nježni, mrežasti omotač.

U polju CA2 u sloju Or u hipoksijskoj skupini bili su prisutni Wfa-pozitivni PNN-ovi, dok u kontrolnoj skupini nisu bili prisutni. U slojevima Py i Rad u hipoksijskoj skupini bili su prisutni PNN-ovi s intenzivnijim Wfa-obojeanjem, dok su u kontrolnoj skupini bili slabije Wfa-pozitivni, tvore nježni, mrežasti omotač te su razgranatiji. U sloju LMol bila je vidljiva najveća razlika između hipoksijske i kontrolne skupine, gdje su bili prisutni Wfa-pozitivni PNN-ovi u hipoksijskoj skupini, ali nešto manji veličinom nego u polju CA1 sloju LMol, dok u kontrolnoj skupini nisu bili prisutni.



U polju CA3 u sloju Or u hipoksijskoj skupini bili su prisutni PNN-ovi koji tvore nježni Wfa-pozitivni omotač, dok u kontrolnoj skupini nisu bili prisutni. U sloju Py u hipoksijskoj skupini bili su prisutni brojniji PNN-ovi s intenzivnijim Wfa-obojeanjem nego u kontrolnoj gdje su bili malobrojniji i slabije Wfa-pozitivni te tvore nježniji omotač. U slojevima, stratum lucidum (SLu) i Rad u hipoksijskoj skupini bili su prisutni brojniji PNN-ovi koji tvore nešto nježniji Wfa-pozitivni omotač nego u polju CA1, dok je u kontrolnoj skupini bilo prisutno vrlo malo nježnih, mrežastih PNN-ova. U sloju LMol u hipoksijskoj skupini bili su prisutni brojniji PNN-ovi s intenzivnijim Wfa-obojeanjem, dok su u kontrolnoj skupini bili prisutni slabije Wfa-pozitivni PNN-ovi koji tvore nježni, mrežasti omotač.

U molekularnom sloju nazubljene vijuge (engl. *molecular layer dentate gyrus*, MoDG) i zratom sloju nazubljene vijuge (engl. *granular layer dentate gyrus*, GrDG) u hipoksijskoj skupini bili su prisutni brojniji PNN-ovi koji tvore nešto nježniji Wfa-pozitivni omotač nego u polju CA1, dok su u kontrolnoj skupini bili prisutni malobrojniji i slabije Wfa-pozitivni PNN-ovi koji tvore nježni omotač. U polimorfnom sloju nazubljene vijuge (engl. *polymorph layer dentate gyrus*, PoDG) u hipoksijskoj skupini bili su prisutni manji PNN-ovi, slabije Wfa-pozitivni, koji tvore nježni omotač, isto kao i u kontrolnoj skupini.

Najveći utjecaj perinatalne hipoksije bio je uočen u povećanju broja PNN/mm<sup>2</sup> u polju CA1 ( $p = 0,0002$ ; slika 22A) i u cijelom hipokampusu ( $p = 0,0044$ ; slika 22E). Učinak perinatalne hipoksije na broj PNN/mm<sup>2</sup> bio je uočen u hipoksijskih ženki u polju CA1 ( $p = 0,0159$ ; slika 23A).

Također, bilo je vidljivo povećanje parvalbuminske imunoreaktivnosti u tijelima interneurona u hipoksijskoj skupini gdje su PV neuroni bili veći, razgranatiji i brojniji, dok su u kontrolnoj skupini bili manji, slabije imunoreaktivni i malobrojniji (slika 21C, C').

U polju CA1 sloju Or u hipoksijskoj skupini bili su prisutni veći, brojniji PV neuroni s jačom imunoreaktivnosti nego u kontrolnoj skupini gdje su PV neuroni bili manji, malobrojniji i slabije imunoreaktivni. U slojevima Py i Rad u hipoksijskoj skupini bili su prisutni veći, razgranatiji, brojniji PV neuroni, dok su u kontrolnoj skupini bili manji, okrugli i malobrojniji. U sloju LMol nije bilo vidljivih imunoreaktivnih PV neurona ni u kontrolnoj ni u hipoksijskoj skupini.

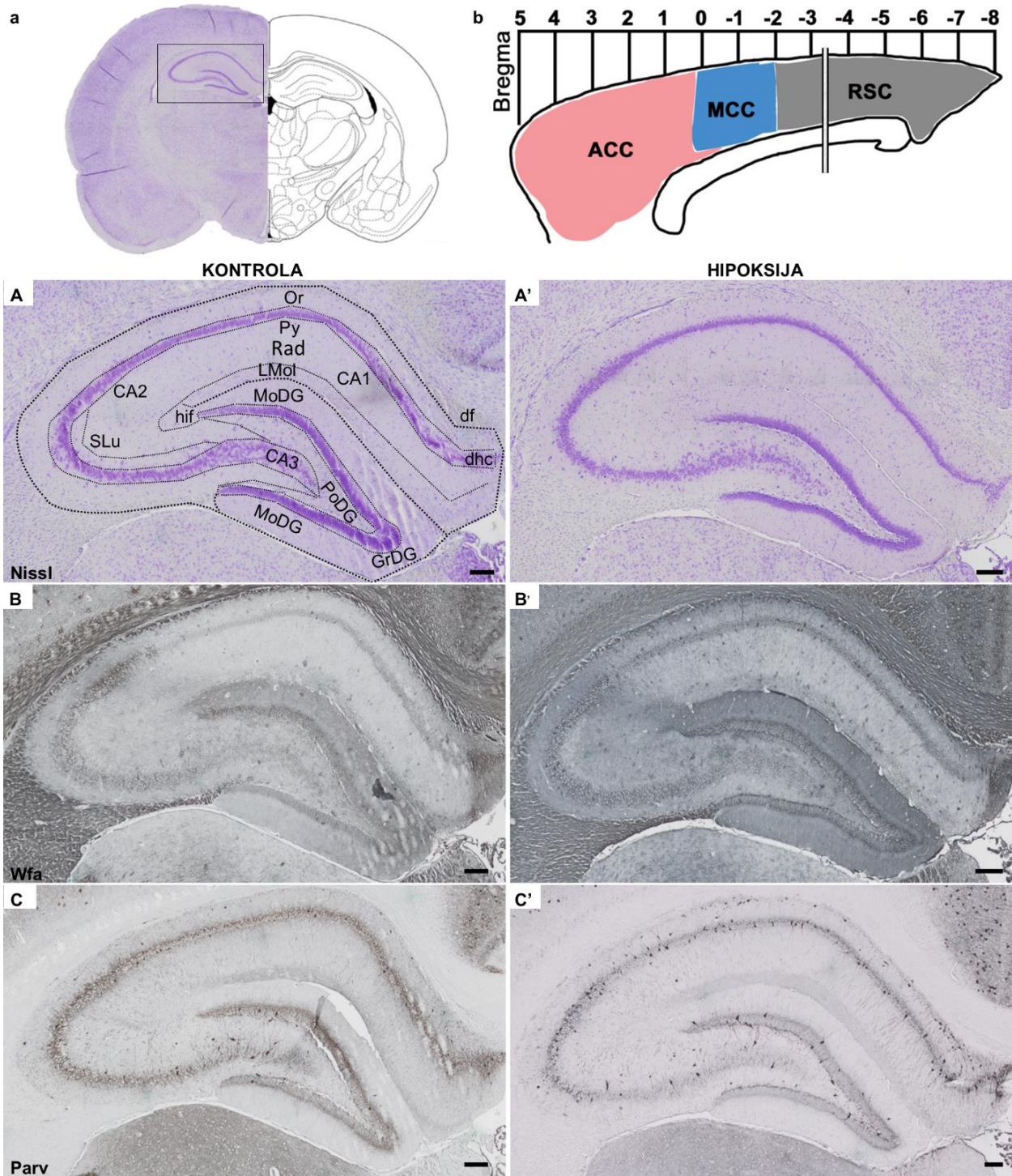


U polju CA2 sloju Or u hipoksijskoj skupini bili su prisutni brojniji, razgranatiji, imunoreaktivniji PV neuroni nego u kontrolnoj skupini. U slojevima Py i Rad u hipoksijskoj skupini bili su prisutni brojniji, razgranatiji, imunoreaktivniji PV neuroni, dok su u kontrolnoj skupini bili malobrojniji, manje razgranati, slabije imunoreaktivni PV neuroni. U sloju LMol nije bilo vidljivih imunoreaktivnih PV neurona ni u kontrolnoj ni u hipoksijskoj skupini.

U polju CA3 u sloju Or u hipoksijskoj skupini bili su prisutni malobrojniji PV neuroni negoli u poljima CA1 i CA2 u sloju Or, dok u kontrolnoj skupini nije bilo vidljivih imunoreaktivnih PV neurona. U sloju Py u hipoksijskoj skupini bili su prisutni veći, razgranatiji, brojniji PV neuroni nego u kontrolnoj skupini gdje su bili manji, okrugli i malobrojni. U sloju SLu i u kontrolnoj i u hipoksijskoj skupini bili su prisutni sitniji, manje imunoreaktivni PV neuroni. U slojevima Rad i LMol nije bilo vidljivih imunoreaktivnih PV neurona ni u kontrolnoj ni u hipoksijskoj skupini.

U sloju MoDG nije bilo vidljivih imunoreaktivnih PV neurona ni u kontrolnoj ni u hipoksijskoj skupini. U sloju GrDG u hipoksijskoj skupini bili su prisutni veći, razgranatiji, brojniji PV neuroni dok su u kontrolnoj skupini bili manji, slabije imunoreaktivni, malobrojniji PV neuroni. U sloju PoDG u hipoksijskoj skupini bili su prisutni veliki, razgranati PV neuroni, dok u kontrolnoj skupini nije bilo vidljivih imunoreaktivnih PV neurona.

Najznačajnija razlika između hipoksijske i kontrolne skupine bila je uočena u povećanju broja PV/mm<sup>2</sup> u polju CA1 (p = 0,0002; slika 24A), u polju CA2 (p = 0,0009; slika 24B), u GD-u (p = 0,0343; slika 24D) i u cijelom hipokampusu (p = 0,0009; slika 24E) u hipoksijskoj skupini. Učinak perinatalne hipoksije na broj PV/mm<sup>2</sup> bio je značajan za oba spola u polju CA2 (slika 25B), dok je u poljima CA1 (slika 25A) i CA3 (slika 25C), u GD-u (slika 25D) i u cijelom hipokampusu bio značajan za hipoksijske ženke (slika 25E).



**Slika 21.** Prikaz zrelog hipokampusa štakorskog mozga 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije ukazuje na razlike u morfologiji PNN-ova, njihov razmještaj prema slojevima u poljima CA1, CA2, CA3 i u GD-u te povećanje parvalbuminske imunoreaktivnosti u tijelima interneurona u

hipoksijskoj skupini. (a) Koronarni presjek kroz veliki mozak na razini bregma - 3,36 mm obojen modifikacijom metode po Nisslu prikazuje područje i polja hipokampusa. Crni pravokutni okvir označava dio hipokampusa prikazan u nastavku s većim povećanjem. (b) Shematski prikaz položaja područja CG-a i polja – ACC-a, MCC-a i RSC-a s obzirom na razinu prema bregmi i položaj iz kojeg su izolirani donji prikazani dijelovi. (A, A') Vidljiva je pravilna laminacija svih slojeva u poljima CA1, CA2 i CA3 i u GD-u te odsutnost vidljivih patoloških značajki. (B, B') Vidljive su razlike u morfologiji, razmještanju prema slojevima u poljima CA1, CA2, CA3 i u GD-u te u broju PNN-ova između hipoksijske i kontrolne skupine. U hipoksijskoj skupini prisutni su brojniji PNN-ovi s intenzivnijim Wfa-obojenjem oko tijela neurona, dok su u kontrolnoj skupini PNN-ovi malobrojniji, slabije Wfa-pozitivni i tvore nježni, mrežasti omotač. Najveća razlika u broju i morfologiji PNN-ova između hipoksijske i kontrolne skupine vidljiva je u sloju LMol u poljima CA1 i CA2, gdje su PNN-ovi brojniji, s intenzivnijim Wfa-obojenjem u hipoksijskoj skupini, dok su u kontrolnoj skupini malobrojniji, slabije Wfa-pozitivni i tvore nježni, mrežasti omotač. (C, C') Vidljivo je povećanje parvalbuminske imunoreaktivnosti u tijelima interneurona u hipoksijskoj skupini gdje su PV neuroni veći, razgranatiji i brojniji, dok su u kontrolnoj skupini manji, slabije imunoreaktivni i malobrojniji. Najveća razlika u broju i morfologiji PV neurona između hipoksijske i kontrolne skupine vidljiva je u slojevima Or, Py i Rad u poljima CA1, CA2 i CA3 te u slojevima GrDG i PoDG gdje su u hipoksijskoj skupini prisutni veći, razgranatiji, brojniji PV neuroni nego u kontrolnoj skupini gdje su manji, okrugli i malobrojni, a u sloju PoDG nisu prisutni. Mjerka za slike (A – C') prikazana je na svakoj slici, a predstavlja 200  $\mu$ m. Reprezentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.

Kvantitativna analiza provedena neuparenim, neparametrijskim Mann-Whitney testom, pokazala je značajan utjecaj perinatalne hipoksije na povećanje broja PNN/mm<sup>2</sup> u polju CA1 (p = 0,0002; slika 22A) u hipoksijskoj skupini. U polju CA2 (p = 0,70; slika 22B) nije bilo značajne razlike u broju PNN/mm<sup>2</sup> između hipoksijske i kontrolne skupine. U polju CA3 (p = 0,07; slika 22C), bila je vidljiva sklonost porasta broja PNN/mm<sup>2</sup> u hipoksijskoj skupini, ali razlika nije bila statistički značajna. U GD-u (p = 0,27; slika 22D) nije bilo značajne razlike u broju PNN/mm<sup>2</sup> između hipoksijske i kontrolne skupine. Bio je vidljiv značajan utjecaj perinatalne hipoksije na povećanje broja PNN/mm<sup>2</sup> u cijelom hipokampusu (p = 0,0044; slika 22E) u hipoksijskoj skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Hipoksijske ženke imale su značajno veći broj PNN/mm<sup>2</sup> u polju CA1 (pŽENKE = 0,02; slika 23A), dok je kod hipoksijskih mužjaka bila vidljiva ista sklonost, ali bez statističke značajnosti (pMUŽJACI = 0,06; slika 23A). U poljima CA2 (pŽENKE = 0,73; pMUŽJACI = 0,29; slika 23B) i CA3 (pŽENKE = 0,29 pMUŽJACI = 0,11 slika 23C) te u GD-u (pŽENKE = 0,29; pMUŽJACI = 0,73; slika 23D) nije bilo vidljivog utjecaja perinatalne hipoksije na spol, dok je u cijelom hipokampusu bila vidljiva sklonost porasta broja PNN/mm<sup>2</sup>, ali bez statističke značajnosti (pŽENKE = 0,06; pMUŽJACI = 0,06; slika 23E) u hipoksijskoj skupini u oba spola 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije.

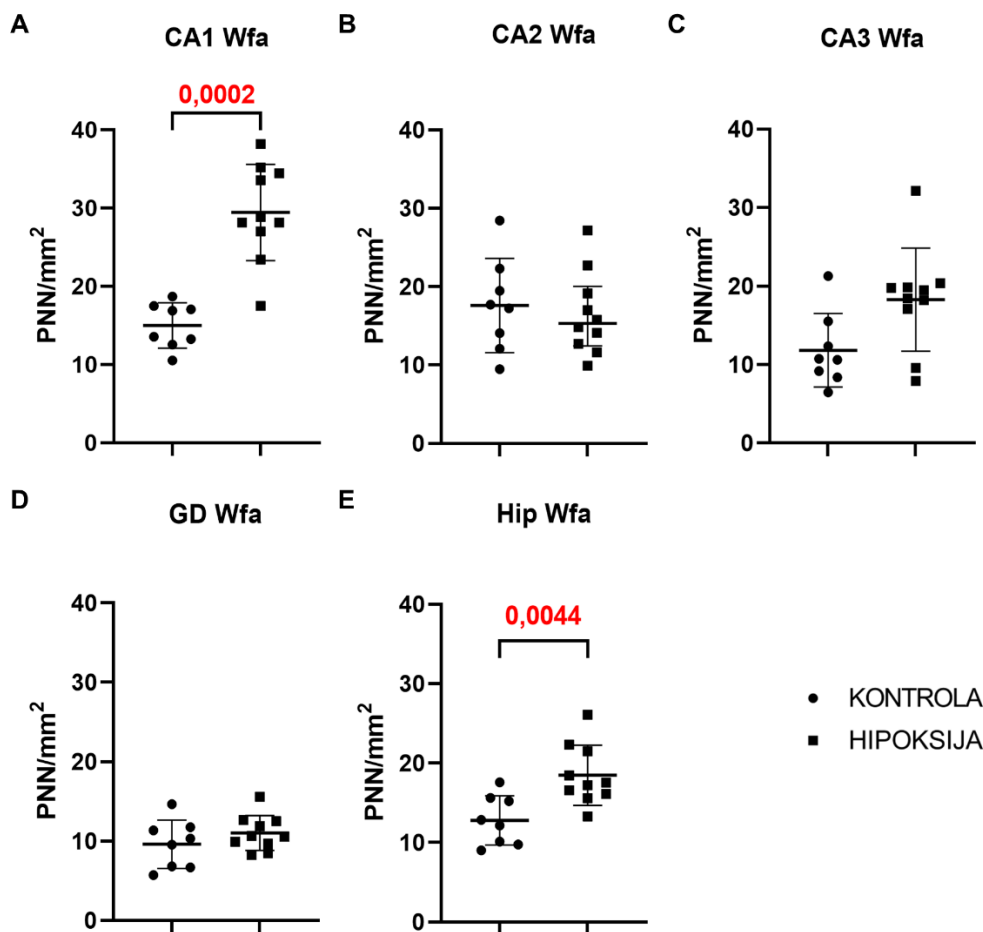
Također, bio je vidljiv i značajan utjecaj perinatalne hipoksije na povećanje broja PV/mm<sup>2</sup> u poljima CA1 (p = 0,0002; slika 24A) i CA2 (p = 0,0009; slika 24B) u hipoksijskoj skupini. U polju CA3 (p = 0,12; slika 24C) nije bilo razlike u broju PV/mm<sup>2</sup> između hipoksijske i kontrolne skupine. Bio je vidljiv značajan utjecaj perinatalne hipoksije na povećanje broja PV/mm<sup>2</sup> u GD-u (p = 0,03; slika 24D) i u cijelom hipokampusu (p = 0,0009; slika 24E) u hipoksijskoj skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Hipoksijske ženke imale su značajno veći broj PV/mm<sup>2</sup> u polju CA1 (pŽENKE = 0,02; slika 25A), dok je kod hipoksijskih mužjaka bila vidljiva ista sklonost, ali bez statističke značajnosti (pMUŽJACI = 0,06; slika 25A). U polju CA2 bio je vidljiv utjecaj perinatalne hipoksije na oba spola (pŽENKE = 0,03; pMUŽJACI = 0,03; slika 25B) u hipoksijskoj skupini. Hipoksijske ženke imale su značajno veći broj PV/mm<sup>2</sup> u polju CA3 (pŽENKE = 0,02; slika 25C), u GD-u (pŽENKE = 0,02; slika 25D) i u cijelom hipokampusu (pŽENKE = 0,02; slika 25E), dok između hipoksijskih

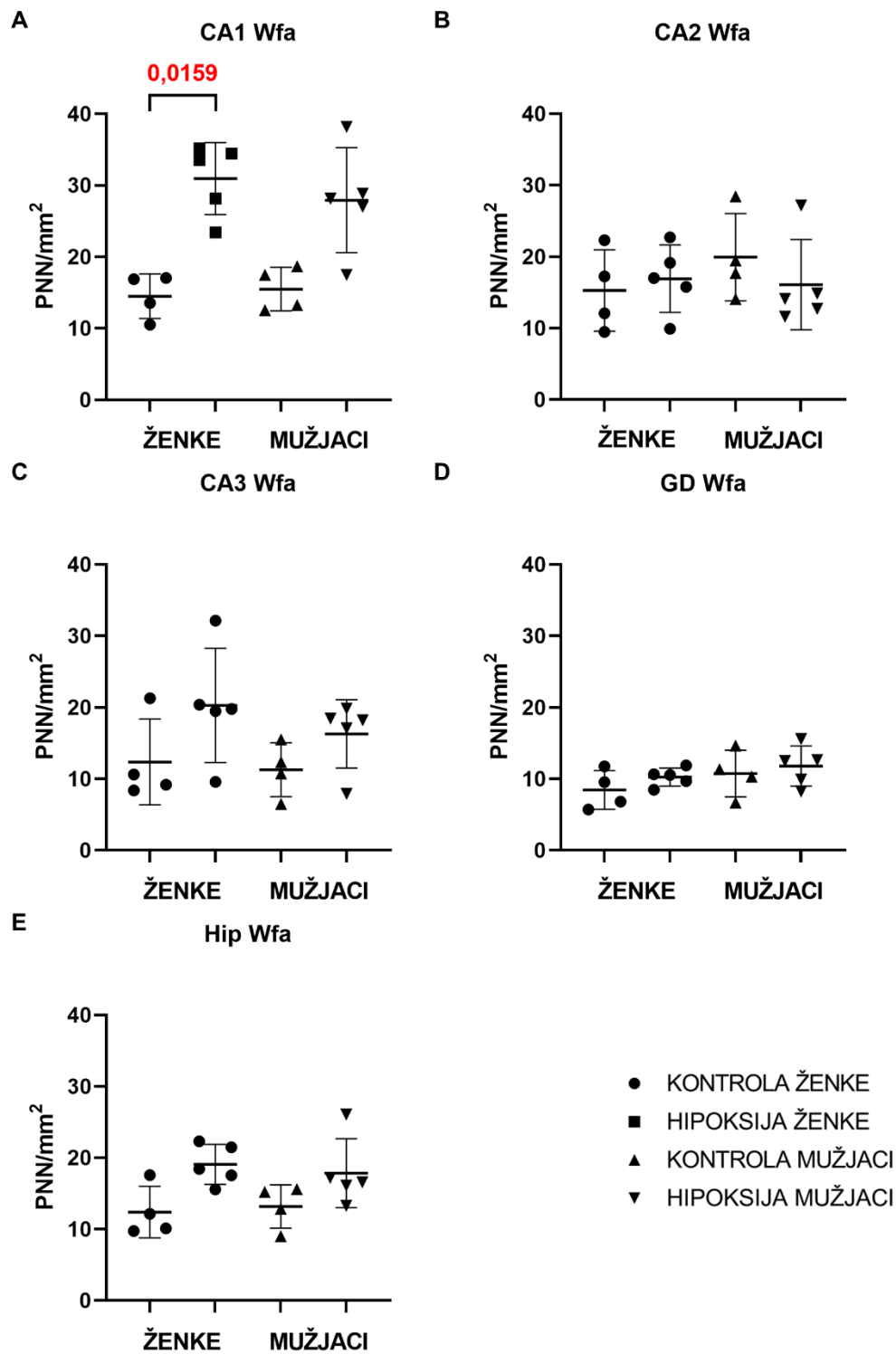
i kontrolnih mužjaka nije bilo razlike u polju CA3 ( $p_{\text{MUŽJACI}} = 0,90$ ; slika 25C), u GD-u ( $p_{\text{MUŽJACI}} = 0,41$ ; slika 25D) i u cijelom hipokampusu ( $p_{\text{MUŽJACI}} = 0,11$ ; slika 25E).

Ugniježđena analiza pokazala je značajan utjecaj perinatalne hipoksije na povećanje broja PNN/mm<sup>2</sup> u cijelom hipokampusu u hipoksijskoj skupini ( $p = 0,0007$ ;  $t = 4,22$ ,  $df = 16$ ; slika 26A) te značajnu razliku između srednjih vrijednosti hipoksijske i kontrolne skupine (Razlika između srednje vrijednosti (KONTROLA - HIPOKSIJA)  $\pm$  SEM =  $- 6,74 \pm 1,60$ ; slika 26B). Također, pokazala je značajan utjecaj perinatalne hipoksije na povećanje broja PV/mm<sup>2</sup> u cijelom hipokampusu u hipoksijskoj skupini ( $p < 0,0001$ ;  $t = 5,41$ ,  $df = 16$ ; slika 26C) te značajnu razliku između srednjih vrijednosti hipoksijske i kontrolne skupine (Razlika između srednje vrijednosti (KONTROLA - HIPOKSIJA)  $\pm$  SEM =  $- 8,54 \pm 1,58$ ; slika 26D).

Omjer broja PNN/mm<sup>2</sup> i PV/mm<sup>2</sup> pokazao je da je u polju CA1 u kontrolnoj skupini bio prisutan gotovo jednaki broj i PNN/mm<sup>2</sup> i PV/mm<sup>2</sup>, dok je u hipoksijskoj skupini bio nešto veći broj PNN/mm<sup>2</sup> nego PV/mm<sup>2</sup> (slika 26E). U polju CA2 u kontrolnoj skupini bio je veći broj PNN/mm<sup>2</sup> nego PV/mm<sup>2</sup>, dok je u hipoksijskoj skupini bio daleko veći broj PV/mm<sup>2</sup> nego PNN/mm<sup>2</sup> (slika 26E). U polju CA3 i u kontrolnoj i u hipoksijskoj skupini bio je veći broj PV/mm<sup>2</sup> nego PNN/mm<sup>2</sup>, ali je bilo vidljivo da je u hipoksijskoj skupini bio veći broj PV/mm<sup>2</sup> nego u kontrolnoj, pa je stoga rezultat omjera bio bliži 1 (slika 26E). U GD-u u kontrolnoj skupini bio je daleko veći broj PNN/mm<sup>2</sup> nego PV/mm<sup>2</sup>, dok je u hipoksijskoj skupini bio gotovo jednaki broj i PNN/mm<sup>2</sup> i PV/mm<sup>2</sup> (slika 26E).



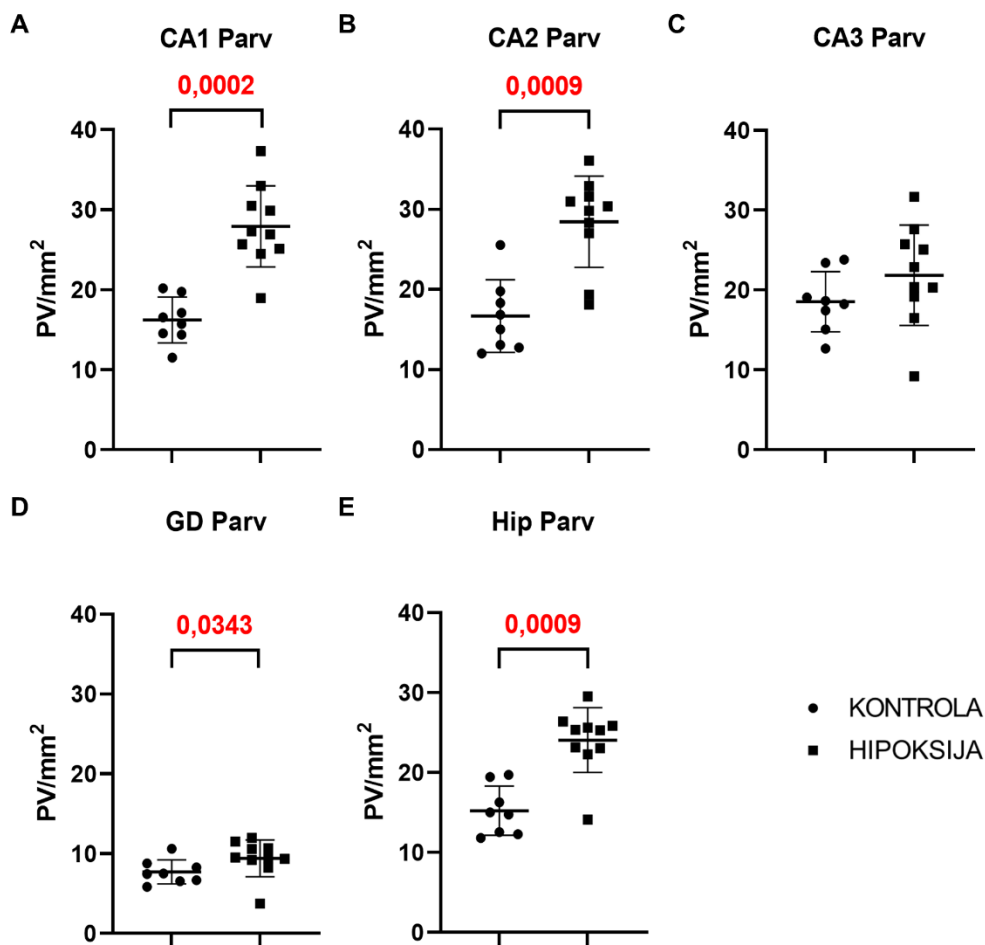
**Slika 22.** Kvantitativne razlike u broju PNN/mm<sup>2</sup> u poljima CA1, CA2, CA3, u GD-u i u cijelom hipokampusu između kontrolne i hipoksijske skupine 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. Kvantitativni rezultati pokazuju značajan utjecaj perinatalne hipoksije na povećanje broja PNN/mm<sup>2</sup> u polju CA1 (A) i u cijelom hipokampusu (E) u hipoksijskoj skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom. U polju CA2 (B) i u GD-u (D) nema razlike u broju PNN/mm<sup>2</sup> između hipoksijske i kontrolne skupine. U polju CA3 (C) vidljiva je sklonost porasta broja PNN/mm<sup>2</sup> u hipoksijskoj skupini, ali razlika nije statistički značajna. Vrijednosti na grafikonima izražene su kao srednja vrijednost  $\pm$ SD od 8 – 10 životinja po skupini.



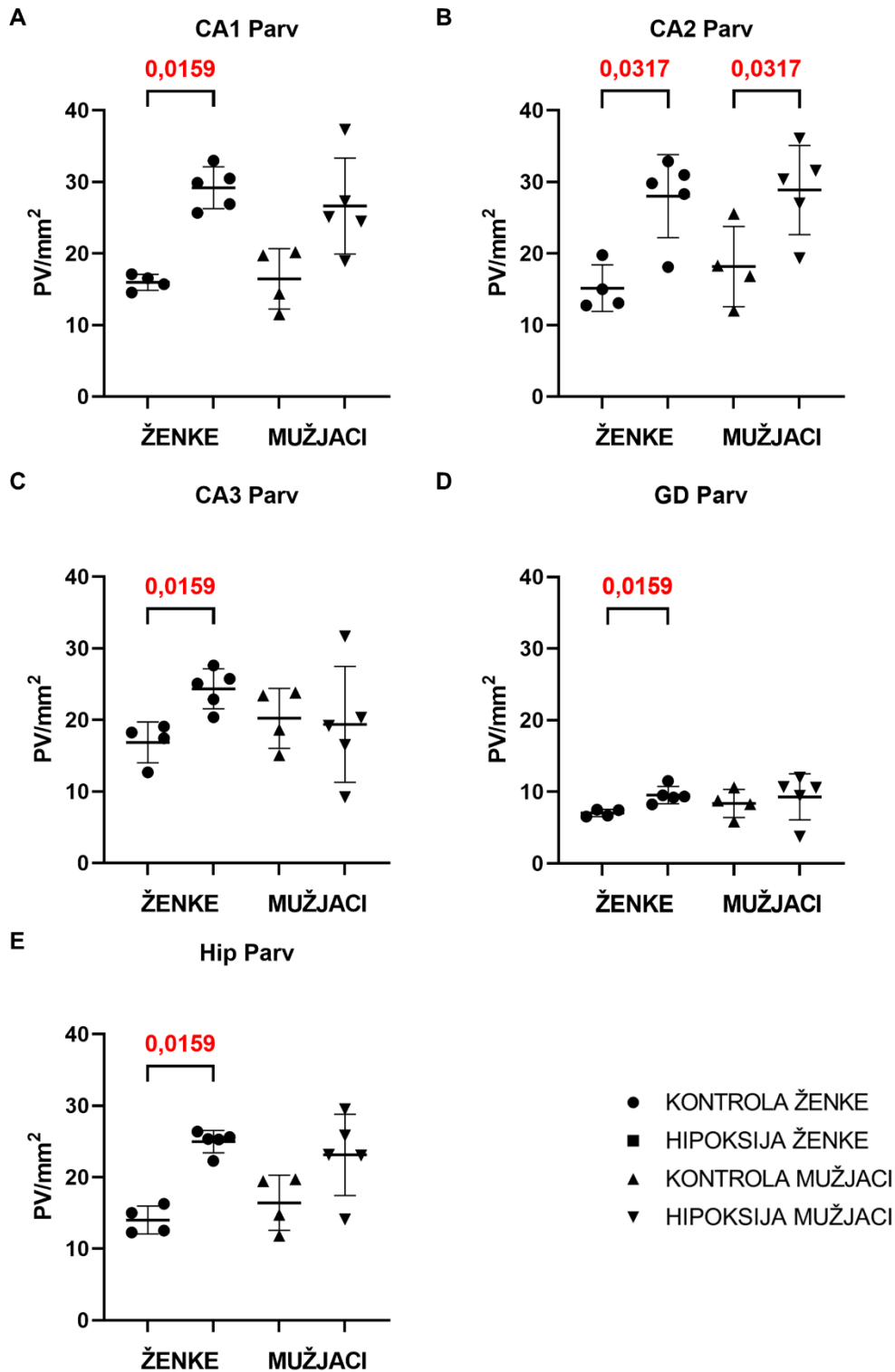
**Slika 23.** Kvantitativne razlike u broju PNN/mm<sup>2</sup> u poljima CA1, CA2, CA3, u GD-u i u cijelom hipokampusu između kontrolnih i hipoksijskih ženki i mužjaka 3,5 mjeseca nakon perinatalne

*hipoksije. Kvantitativni rezultati pokazuju značajan utjecaj perinatalne hipoksije na povećanje broja PNN/mm<sup>2</sup> u polju CA1 u hipoksijskih ženki (A) u usporedbi s kontrolnim ženkama, dok je kod hipoksijskih mužjaka vidljiva ista sklonost, ali bez statističke značajnosti (A) u usporedbi s kontrolnim mužjacima. U poljima CA2 (B) i CA3 (C) te u GD-u (D) nema vidljivog utjecaja perinatalne hipoksije na spol, dok je u cijelom hipokampusu vidljiva sklonost porasta broja PNN/mm<sup>2</sup>, ali razlika nije statistički značajna (E) u hipoksijskoj skupini u oba spola 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. Unutar kontrolne skupine nisu uočene statistički značajne spolne razlike u ovim parametrima. Vrijednosti na grafikonima izražene su kao srednja vrijednost ± SD od 4 – 5 ženki i 4 – 5 mužjaka.*



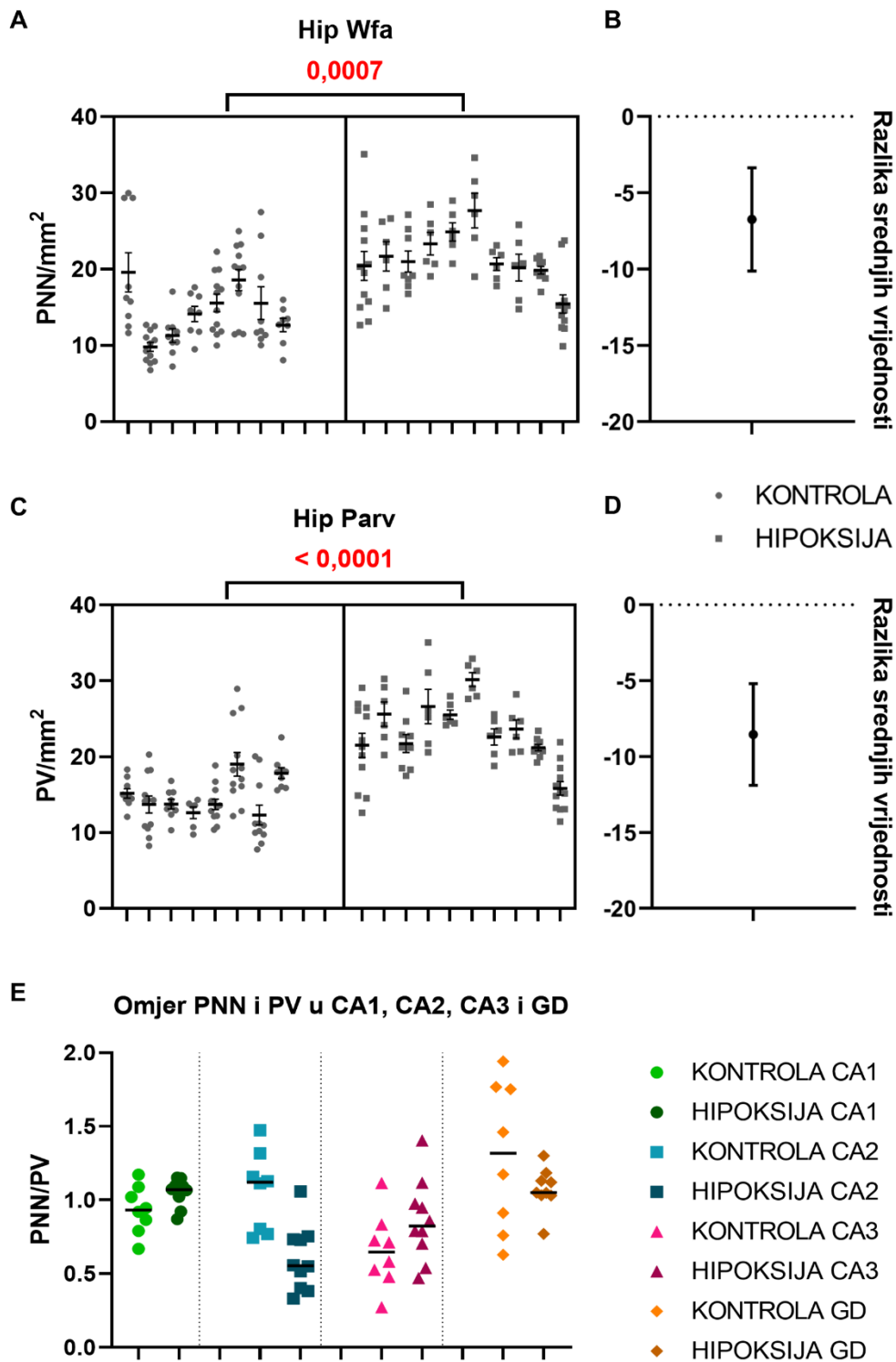


**Slika 24.** Kvantitativne razlike u broju PV/mm<sup>2</sup> u poljima CA1, CA2, CA3, u GD-u i u cijelom hipokampusu između kontrolne i hipoksijske skupine 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. Kvantitativni rezultati pokazuju značajan utjecaj perinatalne hipoksije na povećanje broja PV/mm<sup>2</sup> u poljima CA1 (A) i CA2 (B), u GD-u (D) i u cijelom hipokampusu (E) u usporedbi s kontrolnom skupinom. U polju CA3 (C) nema razlike u broju PV/mm<sup>2</sup> između hipoksijske i kontrolne skupine. Vrijednosti na grafikonima izražene su kao srednja vrijednost ± SD od 8 – 10 životinja po skupini.



**Slika 25.** Kvantitativne razlike u broju PV/mm<sup>2</sup> u poljima CA1, CA2, CA3, u GD-u i u cijelom hipokampusu između kontrolnih i hipoksijskih ženki i mužjaka 3,5 mjeseca nakon perinatalne

*hipoksije. Kvantitativni rezultati pokazuju značajan utjecaj perinatalne hipoksije na povećanje broja PV/mm<sup>2</sup> u polju CA1 u hipoksijskih ženki (A) u usporedbi s kontrolnim ženkama, dok je kod hipoksijskih mužjaka vidljiva ista sklonost, ali razlika nije statistički značajna (A) u usporedbi s kontrolnim mužjacima. U polju CA2 vidljiv je utjecaj perinatalne hipoksije na oba spola (B) u hipoksijskoj skupini. Hipoksijske ženke imaju značajno veći broj PV/mm<sup>2</sup> u polju CA3 (C), u GD-u (D) i u cijelom hipokampusu (E) u usporedbi s kontrolnim ženkama, dok između hipoksijskih i kontrolnih mužjaka nema razlike. Unutar kontrolne skupine nisu uočene statistički značajne spolne razlike u ovim parametrima. Vrijednosti na grafikonima izražene su kao srednja vrijednost ± SD od 4 – 5 ženki i 4 – 5 mužjaka.*



**Slika 26.** Kvantitativne razlike u broju PNN/mm<sup>2</sup> i PV/mm<sup>2</sup> i razlike srednjih vrijednosti u cijelom hipokampusu te omjer PNN/PV u poljima CA1, CA2, CA3 i u GD-u između kontrolne i hipoksijske

*skupine 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. Ugniježđena analiza pokazuje značajan utjecaj perinatalne hipoksije na povećanje broja PNN/mm<sup>2</sup> i PV/mm<sup>2</sup> u cijelom hipokampusu u hipoksijskoj skupini (A, C) te značajnu razliku između srednjih vrijednosti (B, D) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Prikazane su vrijednosti dobivenih N/mm<sup>2</sup> po rezu za cijeli hipokampus u svakoj razini za svakog štakora. Vrijednosti na grafikonima izražene su kao srednja vrijednost ± SEM za 6 -12 dobivenih N/mm<sup>2</sup> po rezu za svakog štakora od 8 – 10 životinja po skupini. Omjer broja PNN/mm<sup>2</sup> i PV/mm<sup>2</sup> (E) pokazuje da je u hipoksijskoj skupini u polju CA1 nešto veći broj PNN/mm<sup>2</sup> nego PV/mm<sup>2</sup>, u polju CA2 daleko veći broj PV/mm<sup>2</sup> nego PNN/mm<sup>2</sup>, u polju CA3 veći je broj PV/mm<sup>2</sup> nego PNN/mm<sup>2</sup>, u GD-u gotovo jednaki broj i PNN/mm<sup>2</sup> i PV/mm<sup>2</sup> u usporedbi s kontrolnom skupinom. Najveća razlika u omjeru vidljiva je u polju CA2, gdje je u kontrolnoj skupini veći broj PNN/mm<sup>2</sup> nego PV/mm<sup>2</sup>, dok je u hipoksijskoj skupini daleko veći broj PV/mm<sup>2</sup> nego PNN/mm<sup>2</sup>. Vrijednosti na grafikonima izražene su kao medijan od 8 – 10 životinja po skupini.*

Nakon utvrđenih razlika u morfologiji i broju PNN-ova i PV neurona između hipoksijske i kontrolne skupine 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije, bila je provedena detaljnija kvalitativna analiza IF metodom dvostrukog obilježavanja za detekciju molekularnih sastavnica PNN-ova – agrekana, neurokana, versikana i njihove kolokalizacije s PV neuronima te kolokalizacije PNN-ova oko NeuN-a, PV neurona i somatostatina u hipokampusu.

Nissl bojenjem bila je utvrđena očuvana citoarhitektonika, pravilna laminacija svih slojeva u poljima CA1, CA2 i CA3 i u GD-u (slika 27A) te odsutnost vidljivih patoloških značajki u kontrolnoj (slika 27B) i hipoksijskoj (slika 27C) skupini 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije.

Bilo je vidljivo da su PV neuroni bili izraženi u slojevima Or, Py i Rad u poljima CA1, CA2 i CA3, u sloju SLu u polju CA3 te u slojevima PoDG i GrDG i u kontrolnoj i u hipoksijskoj skupini. PV neuroni bili su višeg intenziteta izražaja u hipoksijskoj skupini (slika 28B; 29B; 30B; 32D) gdje su tijela interneurona bila izrazito snažno imunoreaktivna na parvalbumin, bili su veći, razgranatiji i brojniji, dok su u kontrolnoj skupini (slika 28A; 29A; 30A; 32C) bili slabije imunoreaktivni, manji i malobrojniji.

Agrekan je, kao sastavnica PNN-ova, bio izražen u kontrolnoj (slika 28C) i hipoksijskoj skupini (slika 28D) u svim slojevima u poljima CA1, CA2, CA3 i u GD-u. U hipoksijskoj skupini agrekan je bio višeg intenziteta izražaja u slojevima Or i LMol u poljima CA1, CA2 i CA3 te u slojevima

MoDG i PoDG u usporedbi s kontrolnom skupinom. U hipoksijskoj skupini agrekan je bio izraženiji tvoreći kondenziraniji omotač oko tijela neurona, dok je u kontrolnoj skupini bio manje izražen tvoreći nježni, mrežasti omotač oko tijela neurona. Također, u sloju Py u poljima CA1, CA2 i CA3 bilo je vidljivo gušće i zbijenije nakupljanje agrekana u hipoksijskoj skupini u usporedbi s kontrolnom. Stupanj kolokalizacije agrekana i PV neurona u kontrolnoj i hipoksijskoj skupini bio je jednak (100 %) jer je u obje skupine kondenzirani agrekan bio izražen oko PV neurona. Međutim, u kontrolnoj skupini broj PV neurona bio je manji pa je ukupno bilo manje stanica koje izražavaju i agrekan i PV neurone, ali je bila prisutna pokoja kolokalizacija u slojevima Or, Py i Rad u poljima CA1, CA2 i CA3 te u sloju GrDG (slika 28E). U hipoksijskoj skupini kolokalizacija je bila prisutna u slojevima Or, Py i Rad u poljima CA1, CA2 i CA3, u slojevima GrDG i PoDG (slika 28F).

Neurokan je, kao sastavnica PNN-ova, bio izražen i u kontrolnoj i hipoksijskoj skupini daleko manje nego u MCC-u, u obliku difuznog i kondenziranog ECM-a nježne, mrežaste strukture. U kontrolnoj skupini kondenziranije nakupljanje neurokana bilo je izraženo u slojevima Or, Py, Rad i LMol u polju CA1 te u sloju SLu u polju CA3, dok je u poljima CA2 i CA3 te u GD-u bio difuzno izražen (slika 29C). U hipoksijskoj skupini bilo je vidljivo kondenziranije nakupljanje neurokana u slojevima Or, Py, Rad i LMol u poljima CA1, CA2 i CA3, u sloju SLu u polju CA3 te u slojevima GrDG i PoDG (slika 29D). Kondenzirani neurokanski ECM nalazio se oko PV neurona u slojevima Or, Py i Rad u polju CA1 te u sloju SLu u polju CA3 u kontrolnoj skupini (slika 29E). U hipoksijskoj skupini bilo je vidljivo nakupljanje kondenziranog neurokanskog ECM-a oko PV neurona u slojevima Or i Py u poljima CA1, CA2, CA3, u sloju SLu u polju CA3 te u sloju PoDG (slika 29F).

Versikan je, kao sastavnica PNN-ova, bio izražen u kontrolnoj skupini u slojevima Or, Py, Rad i LMol u poljima CA1, CA2 i CA3 te u sloju SLu CA3 polja tvoreći nježni, mrežasti omotač oko tijela neurona (slika 30C). U hipoksijskoj skupini bio je također izražen u slojevima Or, Py, Rad i LMol u poljima CA1, CA2 i CA3 te u sloju SLu polja CA3, ali i u slojevima MoDG i GrDG te je bio izraženiji, tvoreći kondenziraniji omotač oko tijela neurona u usporedbi s kontrolnom skupinom (slika 30D). Kondenzirano nakupljanje versikanskog ECM-a oko PV neurona bilo je prisutno u sloju Py u poljima CA1 i CA3 te u sloju SLu polja CA3 u kontrolnoj skupini (slika 30E). U

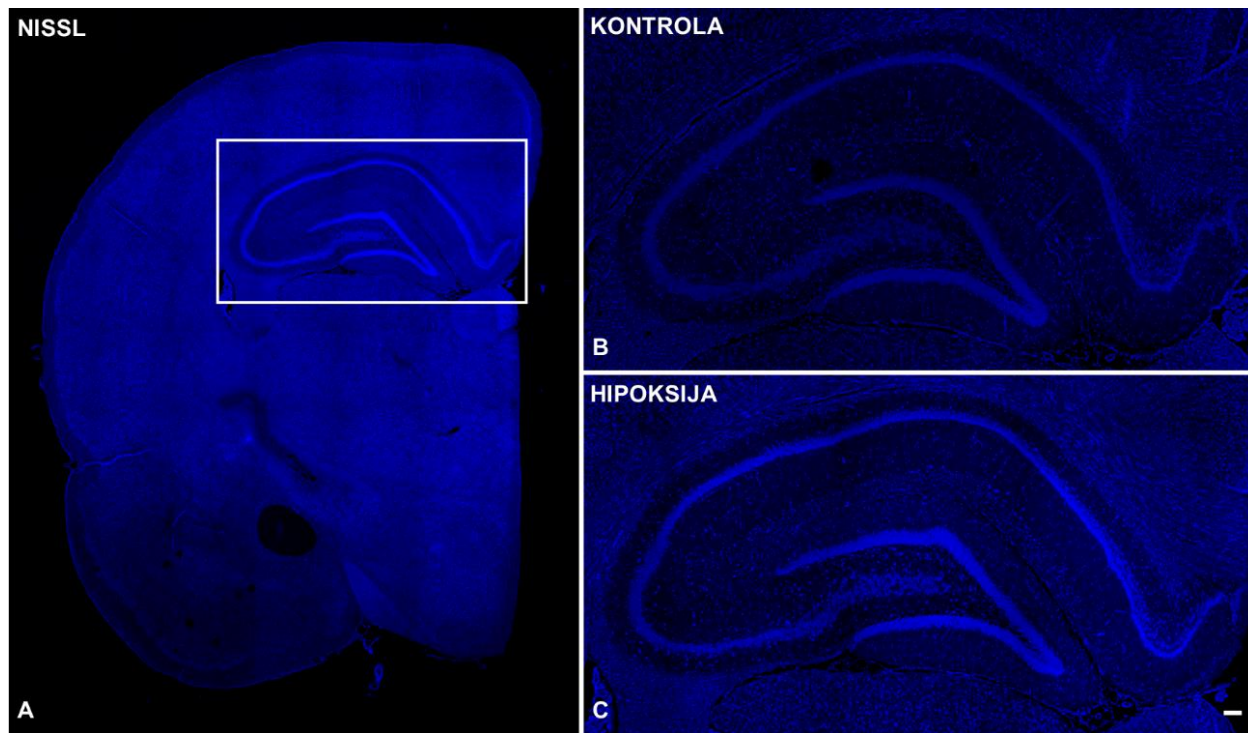
hipoksijskoj skupini kolokalizacija kondenziranog versikana oko PV neurona bila je prisutna u slojevima Or i Py u polju CA1, sloju Or polja CA3 te u sloju GrDG (slika 30F).

Wfa je pokazao mrežastu strukturu PNN-ova koji tvore nježni omotač oko tijela neurona u kontrolnoj skupini u slojevima Or, Py, Rad u poljima CA1, CA2 i CA3, u sloju SLu polja CA3 te u slojevima MoDG i GrDG (slika 31A; 32A; 33A). U hipoksijskoj skupini bili su izraženi razgranatiji, brojniji PNN-ovi s intenzivnijim i kondenziranijim Wfa-obojeanjem također u slojevima Or, Py, Rad u poljima CA1, CA2 i CA3 te u slojevima MoDG i GrDG, ali i u sloju LMol u polju CA1 te u sloju PoDG. Bio je vidljiv slabiji intenzitet izražaja PNN-ova u sloju Py polja CA1 (slika 31B; 32B; 33B) u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Bilo je vidljivo da su NeuN-pozitivni neuroni bili izraženi u svim slojevima u poljima CA1, CA2, CA3 i u GD-u u kontrolnoj (slika 31C) i hipoksijskoj skupini (slika 31D). U hipoksijskoj skupini NeuN-pozitivni neuroni bili su gušći, zbijeniji u sloju Py u poljima CA1, CA2 i CA3 i u sloju GrDG u usporedbi s kontrolnom skupinom. Činili su se izraženiji u hipoksijskoj skupini u sloju LMol u poljima CA1, CA2 i CA3, a posebice je bilo vidljivo nakupljanje NeuN-pozitivnih neurona u sloju LMol polja CA2 u usporedbi s kontrolnom skupinom. Kondenzirani ECM u obliku PNN-ova oko NeuN-pozitivnih neurona bio je vidljiv u sloju Py u poljima CA1, CA2 i CA3 te u slojevima MoDG i GrDG u kontrolnoj (slika 31E) i u hipoksijskoj skupini (slika 31F), gdje je bio vidljiv još i u sloju PoDG.

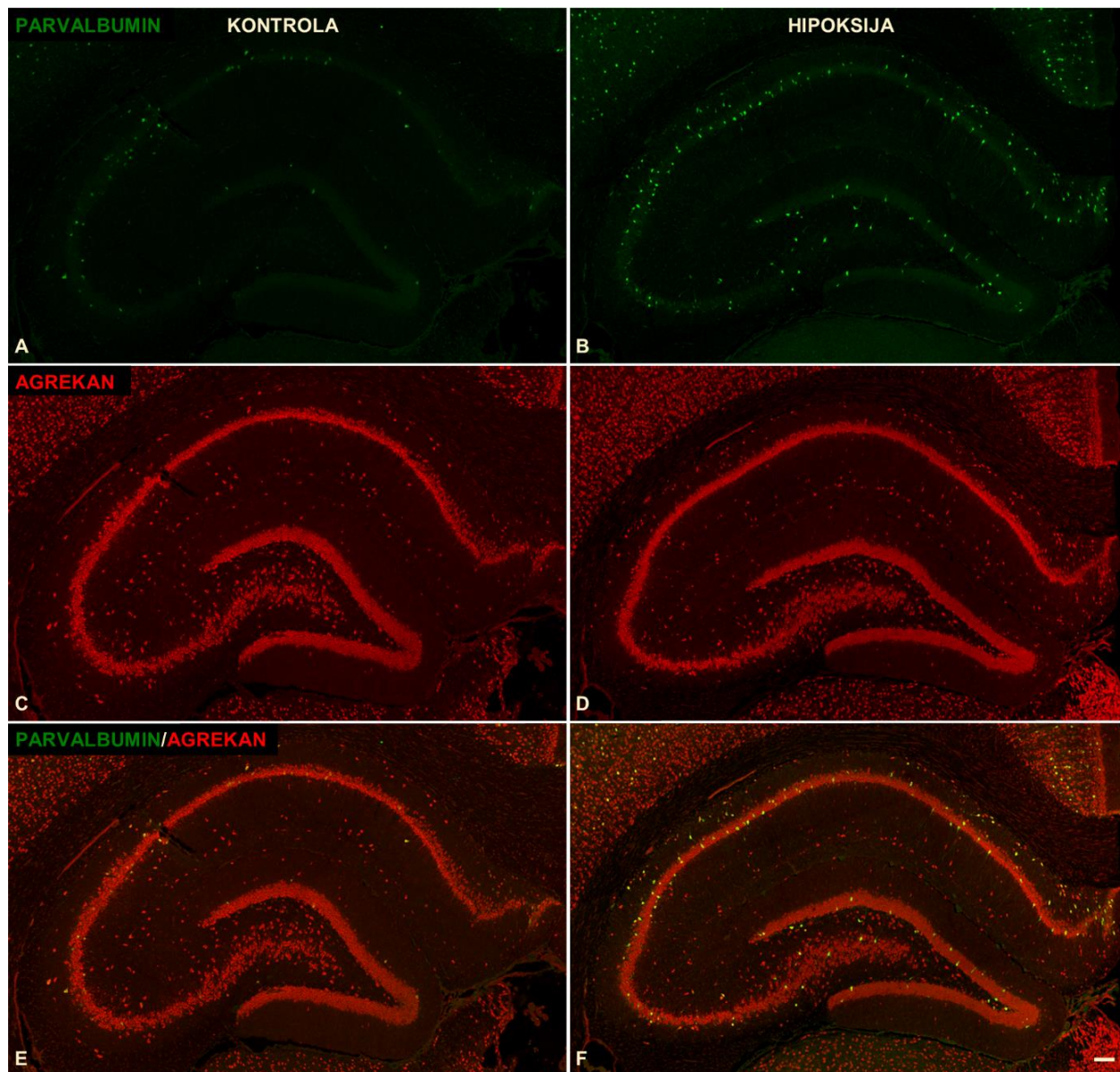
Nakupljanje kondenziranog ECM-a u obliku PNN-ova oko PV neurona u kontrolnoj skupini bilo je manje izraženo i bila je prisutna pokoja kolokalizacija u sloju Py u poljima CA1, CA2 i CA3 te u sloju GrDG (slika 32E). U hipoksijskoj skupini kolokalizacija PNN-ova oko PV neurona bila je vidljiva u slojevima Or, Py i Rad u poljima CA1, CA2 i CA3 te u sloju GrDG (slika 32F). U obje skupine bili su vidljivi PNN-ovi koji se ne nalaze oko PV neurona.

Bilo je vidljivo da su somatostatin-pozitivni interneuroni bili izraženi u slojevima Or, Py i Rad u poljima CA1, CA2 i CA3 u kontrolnoj skupini (slika 33C). U hipoksijskoj skupini somatostatin-pozitivni interneuroni bili su brojniji i izraženiji u slojevima Or, Py, Rad u poljima CA1, CA2 i CA3, u sloju SLu polja CA3 te u sloju PoDG (slika 33D). Nakupljanje kondenziranog ECM-a u obliku PNN-ova oko somatostatin-pozitivnih interneurona nije bilo vidljivo niti u kontrolnoj (slika 33E) niti u hipoksijskoj skupini (slika 33F).



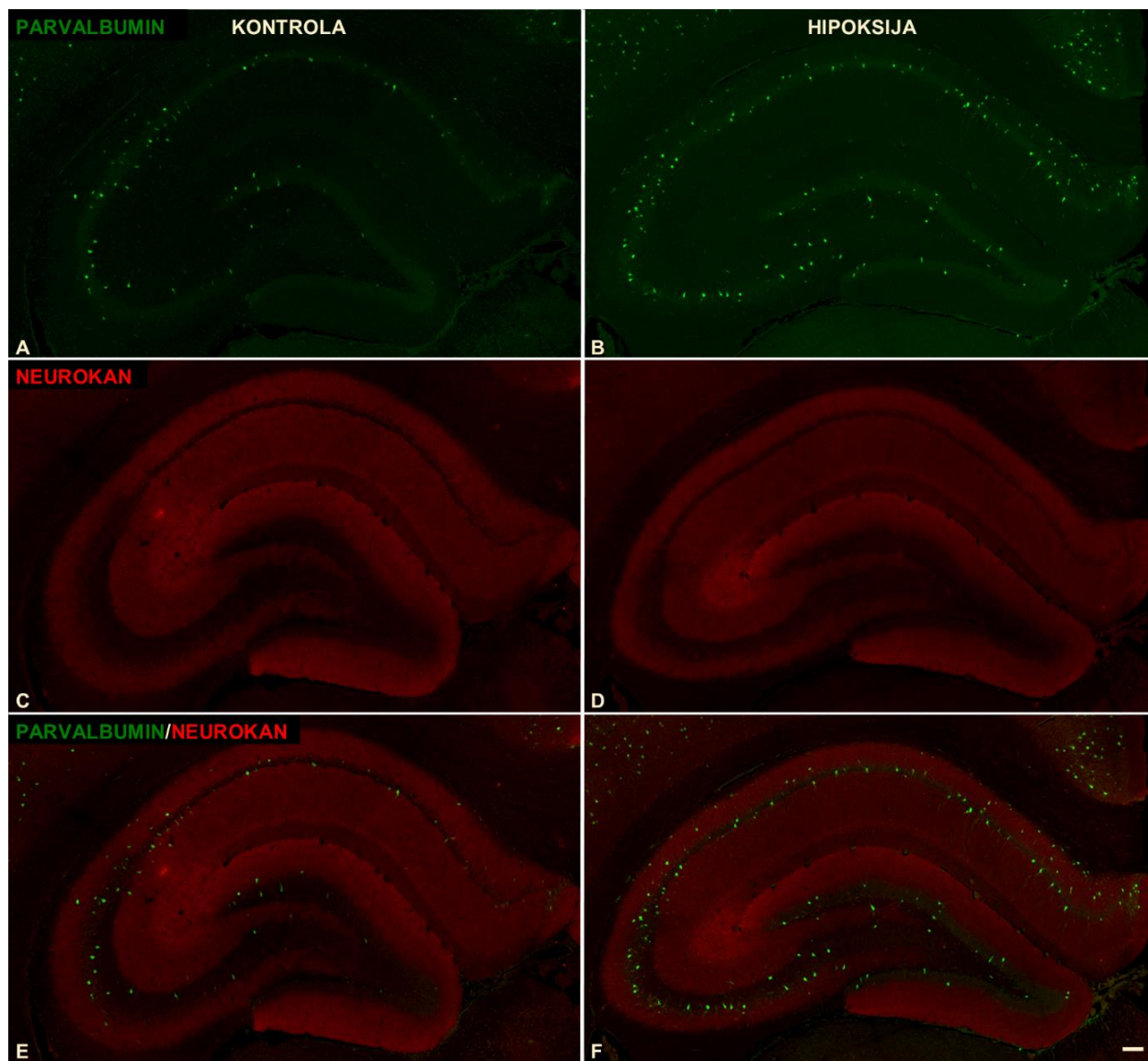
**Slika 27.** Prikaz zrelog hipokampusa štakorskog mozga 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije Nissl bojenjem. (A) Koronarni presjek kroz veliki mozak na razini bregma - 3,36 mm obojen Nissl bojenjem prikazuje područje hipokampusa. Bijeli pravokutni okvir označava dio hipokampusa prikazan u nastavku s većim povećanjem. Prikazana je očuvana gruba citoarhitektonika, održana pravilna laminacija svih slojeva u poljima CA1, CA2 i CA3 i u GD-u u kontrolnih (B) i hipoksijskih štakora (C). Mjerka za slike (B, C) prikazana je na slici (C), a predstavlja 400  $\mu\text{m}$ . Reprezentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.





**Slika 28.** Prikaz izražaja agrekana, kao sastavnice PNN-ova, i njegove kolokalizacije s PV neuronima u zrelom hipokampusu štakorskog mozga 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. PV neuroni su izraženi u slojevima Or, Py i Rad u poljima CA1, CA2 i CA3, u sloju SLu u polju CA3 te u slojevima PoDG i GrDG u kontrolnoj (A) i hipoksijskoj skupini (B), ali su izraženiji u hipoksijskoj skupini gdje su tijela interneurona izrazito snažno imunoreaktivna na parvalbumin. Agrekan je izražen u svim slojevima u poljima CA1, CA2, CA3 i u GD-u i u kontrolnoj (C) i u hipoksijskoj skupini (D). U hipoksijskoj skupini agrekan je višeg intenziteta izražaja u slojevima Or i LMol u poljima CA1, CA2 i CA3 te u slojevima MoDG i PoDG u usporedbi s kontrolnom

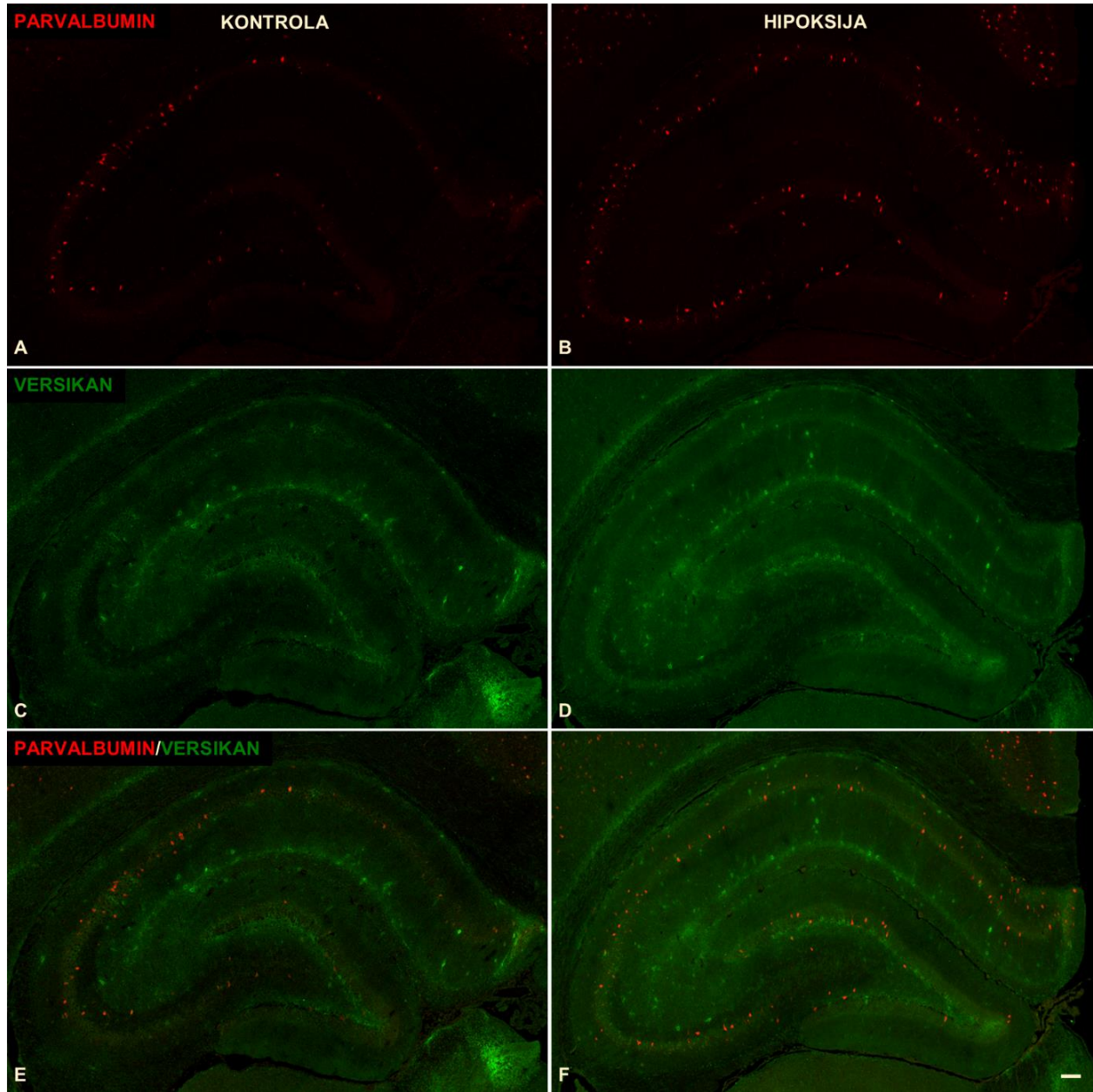
skupinom. U kontrolnoj skupini broj PV neurona je manji pa ukupno ima manje stanica koje izražavaju i agrekan i PV neurone, ali je prisutna pokoja kolokalizacija u slojevima Or, Py i Rad u poljima CA1, CA2 i CA3 te u sloju GrDG (E). U hipoksijskoj skupini kolokalizacija je prisutna u slojevima Or, Py i Rad u poljima CA1, CA2 i CA3 te u slojevima GrDG i PoDG (F). Mjerka za slike (A – F) prikazana je na slici (F), a predstavlja 400  $\mu$ m. Reprezentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.



**Slika 29.** Prikaz izražaja neurokana, kao sastavnice PNN-ova, i njegove kolokalizacije s PV neuronima u zrelom hipokampusu štakorskog mozga 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. Neurokan je u kontrolnoj skupini izražen u slojevima Or, Py, Rad i LMol u polju CA1 te u sloju

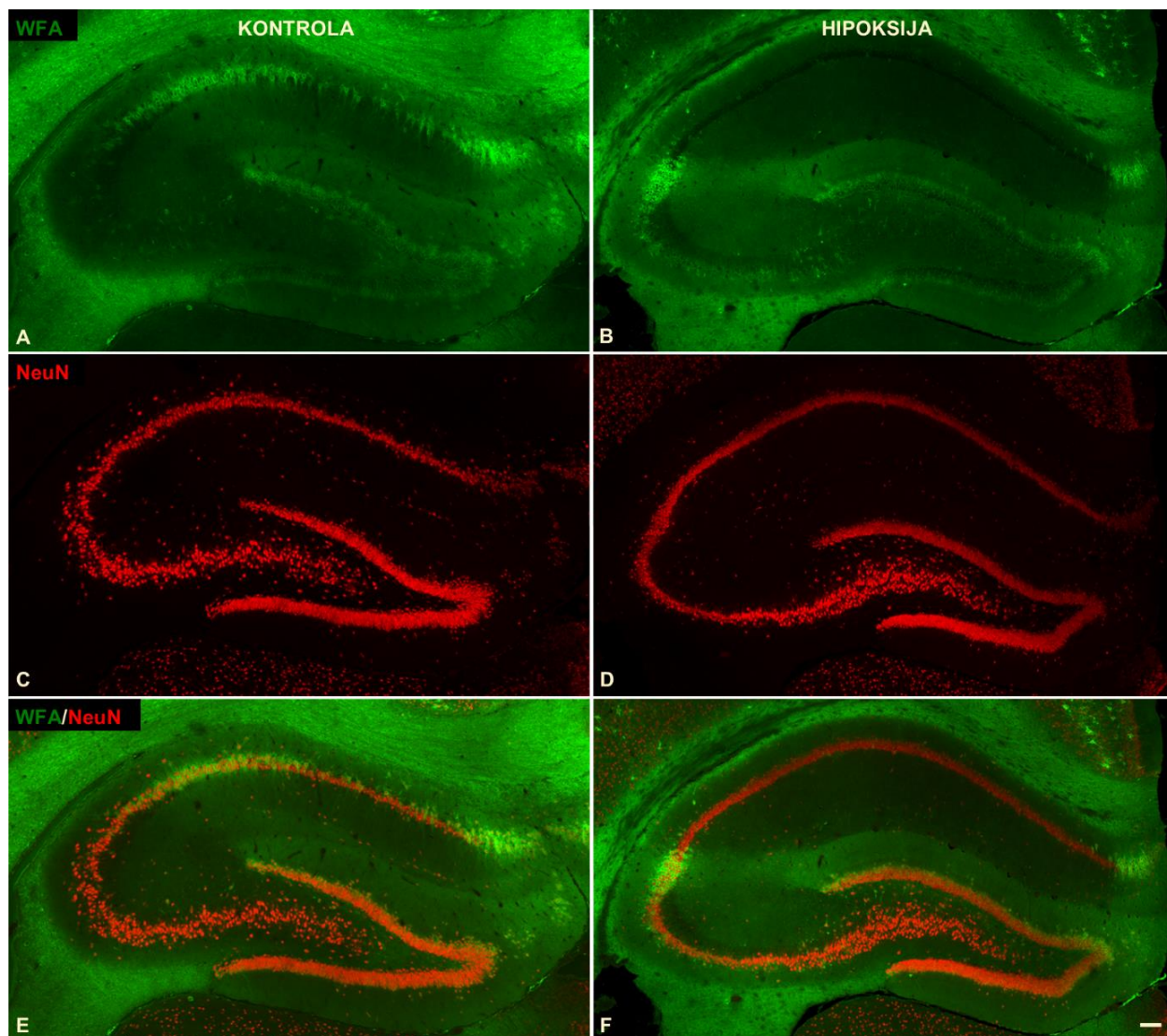
*SLu u polju CA3 (C). U hipoksijskoj skupini vidljivo je kondenziranije nakupljanje neurokana u slojevima Or, Py, Rad i LMol u poljima CA1, CA2 i CA3, u sloju SLu u polju CA3 te u slojevima GrDG i PoDG (D). Kondenzirani neurokan nalazi se oko PV neurona u slojevima Or, Py i Rad u polju CA1 te u sloju SLu u polju CA3 u kontrolnoj skupini (E). U hipoksijskoj skupini vidljivo je nakupljanje kondenziranog neurokana oko PV neurona u slojevima Or i Py u poljima CA1, CA2, CA3, u sloju SLu u polju CA3 te u sloju PoDG (F), što je očekivano jer su PV neuroni brojniji i višeg intenziteta izražaja u hipoksijskoj (B) nego u kontrolnoj skupini (A). Mjerka za slike (A – F) prikazana je na slici (F), a predstavlja 400  $\mu$ m. Reprezentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.*





**Slika 30.** Prikaz izražaja versikana, kao sastavnice PNN-ova, i njegove kolokalizacije s PV neuronima u zrelom hipokampusu štakorskog mozga 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. Versikan je izražen i u kontrolnoj (C) i u hipoksijskoj skupini (D) u slojevima Or, Py, Rad i LMol u poljima CA1, CA2 i CA3 te u sloju SLu polja CA3. U hipoksijskoj skupini izražen je i u slojevima MoDG i GrDG te je kondenziraniji i izraženiji nego u kontrolnoj skupini. Kondenzirano nakupljanje versikanskog ECM-a oko PV neurona prisutno je u sloju Py u poljima CA1 i CA3 te u sloju SLu polja CA3 u kontrolnoj skupini (E). U hipoksijskoj skupini kolokalizacija kondenziranog

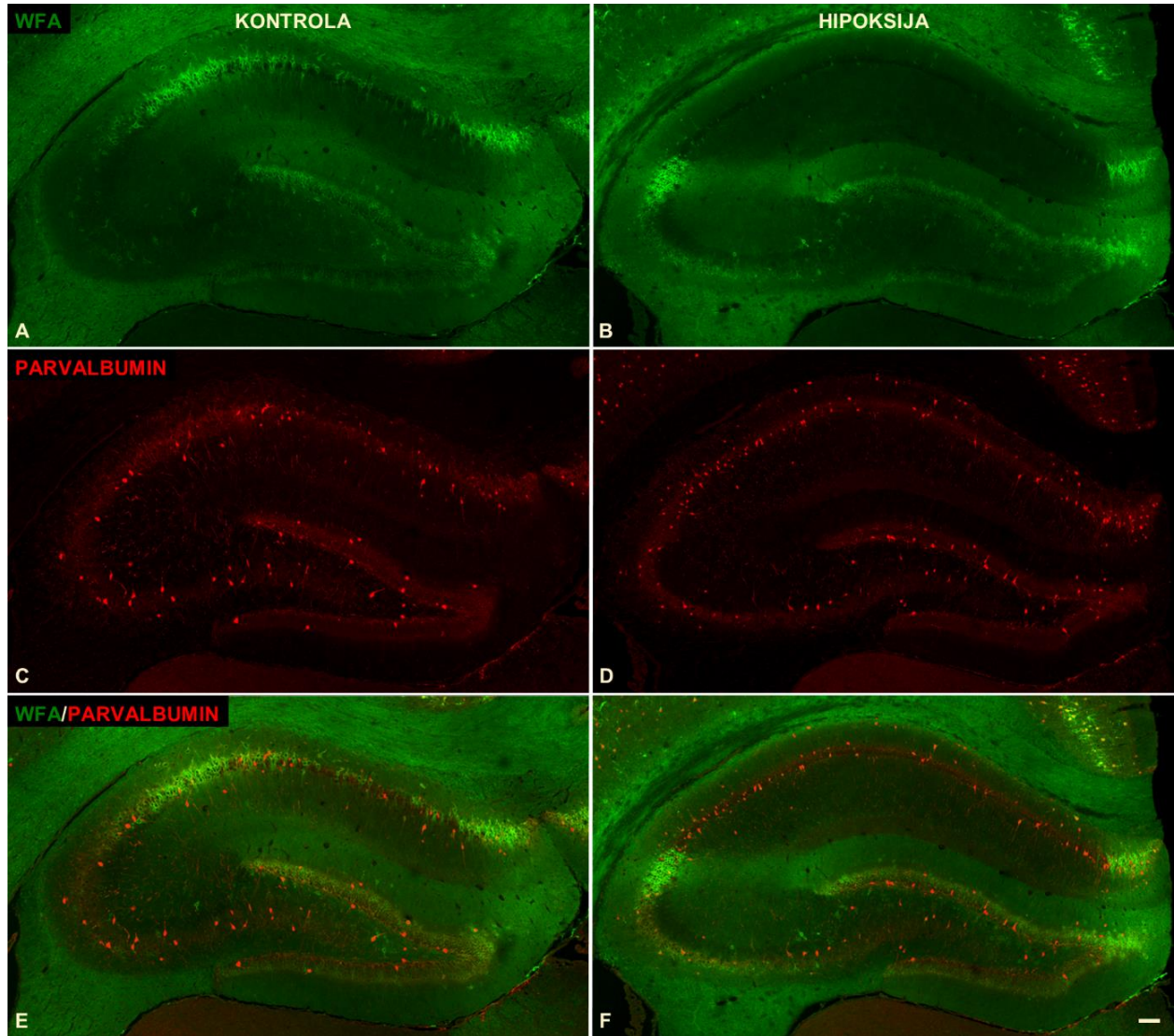
versikana oko PV neurona prisutna je u slojevima Or i Py u polju CA1, sloju Or polja CA3 te u sloju GrDG (F), što je očekivano s obzirom na to da su PV neuroni brojniji i višeg intenziteta izražaja u hipoksijskoj (B) nego u kontrolnoj skupini (A). Mjerka za slike (A – F) prikazana je na slici (F), a predstavlja 400  $\mu$ m. Reprerzentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.



**Slika 31.** Prikaz izražaja PNN-ova i njihove kolokalizacije s NeuN-pozitivnim neuronima u zrelom hipokampusu štakorskog mozga 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. WFA prikazuje mrežastu strukturu PNN-ova koji tvore nježni omotač oko tijela neurona u kontrolnoj skupini u slojevima Or, Py, Rad u poljima CA1, CA2 i CA3, u sloju SLu polja CA3 te u slojevima MoDG i GrDG (A). U hipoksijskoj skupini izraženi su razgranatiji, brojniji PNN-ovi s intenzivnijim i kondenziranim

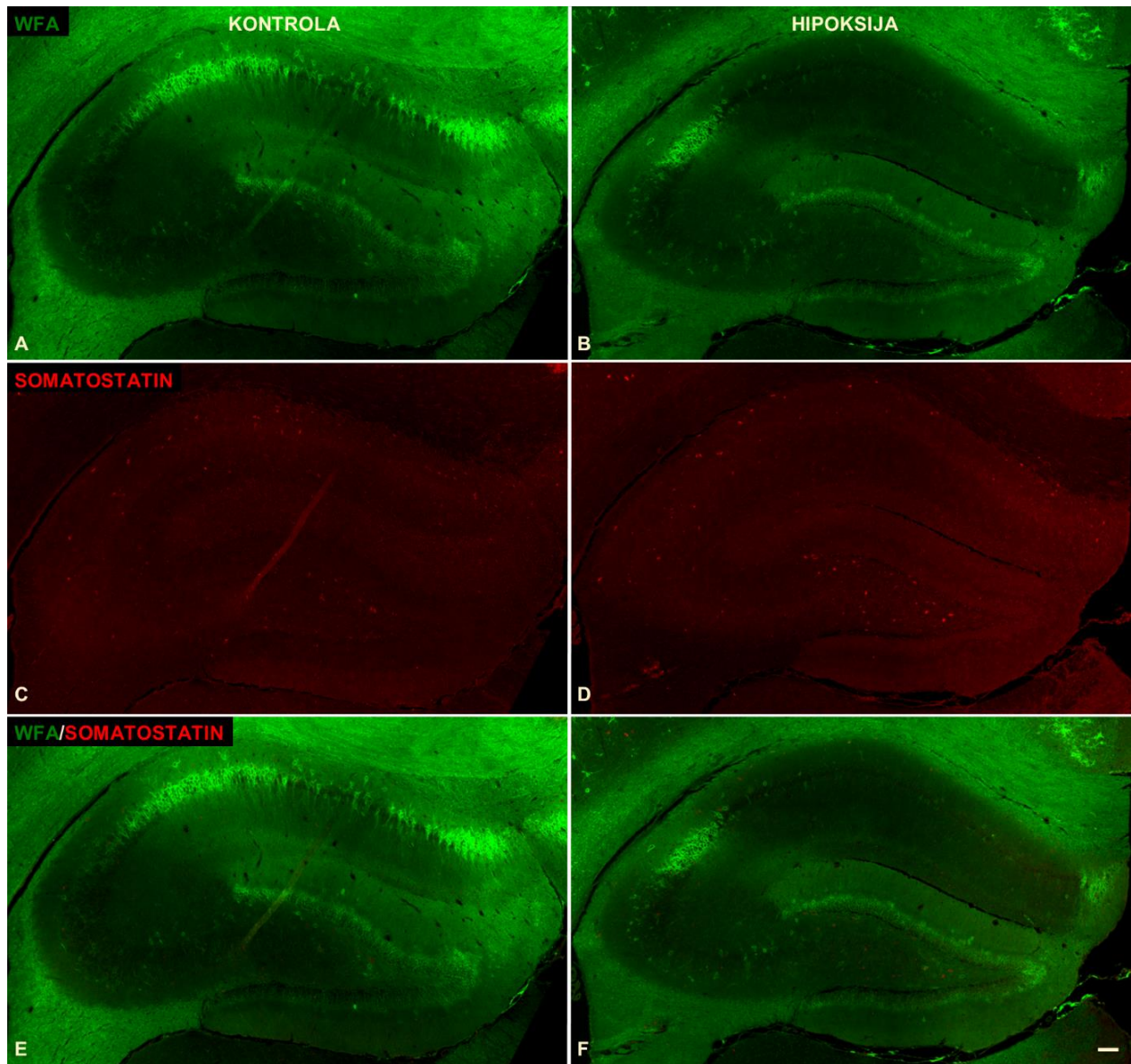
*Wfa-obojeanjem također u slojevima Or, Py, Rad u poljima CA1, CA2 i CA3 te u slojevima MoDG i GrDG, ali i u sloju LMol polja CA1 te u sloju PoDG, sa slabijim intenzitetom izražaja u sloju Py polja CA1 (B) u usporedbi s kontrolnom skupinom. NeuN-pozitivni neuroni izraženi su u svim slojevima u poljima CA1, CA2, CA3 i u GD-u u kontrolnoj (C) i hipoksijskoj skupini (D). U hipoksijskoj skupini su gušći, zbijeniji u sloju Py u poljima CA1, CA2 i CA3 i u sloju GrDG. Također je vidljivo nakupljanje NeuN-pozitivnih neurona u sloju LMol polja CA2 u usporedbi s kontrolnom skupinom. Kondenzirani ECM u obliku PNN-ova oko NeuN-pozitivnih neurona vidljiv je u sloju Py u poljima CA1, CA2 i CA3 te u slojevima MoDG i GrDG u kontrolnoj (E) i u hipoksijskoj skupini (F). Međutim, u hipoksijskoj skupini vidljiva je kolokalizacija PNN-ova oko NeuN-pozitivnih neurona još i u sloju PoDG. Mjerka za slike (A – F) prikazana je na slici (F), a predstavlja 400 µm. Reprezentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.*





**Slika 32.** Prikaz izražaja PNN-ova i njihove kolokalizacije s PV neuronima u zrelom hipokampusu štakorskog mozga 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. PV neuroni su izraženi u slojevima Or, Py i Rad u poljima CA1, CA2 i CA3, u sloju SLu u polju CA3 te u slojevima PoDG i GrDG u kontrolnoj (A) i hipoksijskoj skupini (B). Međutim, u hipoksijskoj skupini tijela interneurona su izrazito snažno imunoreaktivna na parvalbumin te su brojniji i izraženiji. Nakupljanje kondenziranog ECM-a u obliku PNN-ova oko PV neurona u kontrolnoj skupini manje je izraženo i prisutna je pokoja kolokalizacija u sloju Py u poljima CA1, CA2 i CA3 te u sloju GrDG (E). U hipoksijskoj skupini kolokalizacija PNN-ova oko PV neurona vidljiva je u slojevima Or, Py i Rad u poljima CA1, CA2 i CA3 te u sloju GrDG (F), što je očekivano s obzirom na to da su PNN-ovi brojniji i višeg intenziteta izražaja u hipoksijskoj (B) nego u kontrolnoj skupini (A). Mjerka za slike

(A – F) prikazana je na slici (F), a predstavlja 400  $\mu$ m. Reprezentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.



**Slika 33.** Prikaz dvostruko obilježenog reza koji prikazuje izražaj PNN-ova (WFA) i somatostatin-pozitivnih interneurona u zrelom hipokampusu štakorskog mozga 3,5 mjeseca nakon perinatalne hipoksije. Somatostatin-pozitivni interneuroni izraženi su u slojevima Or, Py i Rad u poljima CA1, CA2 i CA3 u kontrolnoj skupini (C), dok su u hipoksijskoj skupini brojniji i izraženiji u slojevima Or, Py, Rad u poljima CA1, CA2 i CA3, u sloju SLu polja CA3 te u sloju PoDG (D). Nakupljanje kondenziranog ECM-a u obliku PNN-ova oko somatostatin-pozitivnih interneurona nije vidljivo



нити u kontrolnoj (E) niti u hipoksijskoj skupini (F), premda su PNN-ovi izraženi i u kontrolnoj (A) i u hipoksijskoj skupini (B) gdje su razgranatiji, brojniji PNN-ovi s intenzivnijim i kondenziranim Wfa-obojeanjem. Mjerka za slike (A – F) prikazana je na slici (F), a predstavlja 400  $\mu\text{m}$ . Reprezentativna slika predstavlja rezultate od tri nezavisna pokusa.

#### **5.4. Promjene u ponašanju mladih (P30) i odraslih (P70) štakora**

Rezultati testiranja ponašanja otkrili su značajnu hiperaktivnost i sporiji tempo učenja u štakora koji su bili podvrgnuti perinatalnoj hipoksiji. Rezultati testiranja ponašanja detaljno su opisani u objavljenom radu: Trnski *i sur.* 2022. (129) koji se nalazi na kraju ovog doktorskog rada.

Test otvorenog polja pokazao je značajan utjecaj hipoksije na horizontalnu ( $p < 0,01$ ) i vertikalnu ( $p < 0,05$ ) aktivnost u mladim štakora. U odrasloj dobi srednje vrijednosti izmjerenih parametara smanjile su se u svim podskupinama, osim u hipoksijskih ženki.

Test ploče s rupama pokazao je značajan utjecaj hipoksije na istraživačko ponašanje ( $p < 0,05$ ) u mladoj dobi zbog značajnih razlika između kontrolnih i hipoksijskih mužjaka, ali ne i između ženki. U odrasloj dobi srednje vrijednosti znatno su se smanjile u mužjaka u odnosu na ženke što rezultira znatno većim istraživačkim ponašanjem u ženki nego u mužjaka ( $p < 0,001$ ).

Test socijalnog izbora pokazao je značajan utjecaj spola na vrijeme provedeno sa životinjom iste vrste ( $p < 0,05$ ) u mladoj dobi. Kontrolne ženke istraživale su životinju iste vrste znatno dulje nego kontrolni mužjaci, dok su srednje vrijednosti hipoksijskih ženki i mužjaka podjednake. U odrasloj dobi nije bio uočen utjecaj hipoksije, spola ili njihove interakcije na društveno ponašanje.

T-labirint pokazao je značajan utjecaj dana testiranja na broj točnih odabira u mladim ženki ( $p < 0,0001$ ), odnosno na prostorno učenje. U odraslih ženki broj točnih odabira poboljšavao se tijekom dana testiranja ( $p < 0,0001$ ), ali krivulja učenja bila je manje strma nego u mladoj dobi. U mladim mužjaka bilo je vidljivo da su i hipoksija ( $p < 0,05$ ) i dani testiranja ( $p < 0,0001$ ) značajno utjecali na broj točnih odabira. U odraslih mužjaka dani testiranja još uvijek su značajno utjecali na broj točnih odabira ( $p < 0,0001$ ), ali je krivulja učenja također bila izravnana.

## 6. RASPRAVA

Iako postoji velik broj istraživanja hipoksijske ozljede, do sada nisu istraženi odnosi između hipoksije i promjena u izvanstaničnoj tvari koje su prisutne tijekom dužeg vremenskog perioda na histološkoj i molekularnoj razini te promjene u ponašanju nakon umjerene neinvazivne kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije. Navedeno bi moglo biti ključno za razumijevanje uzročno-posljedične veze čimbenika u patofiziologiji nekoliko poremećaja koji se javljaju nakon hipoksijske ozljede, a zbog čega su ovakva istraživanja bitna za poboljšanje preventivnih i terapijskih strategija. U razvijenim zemljama stopa preživljavanja nedonoščadi i novorođenčadi je vrlo visoka zbog kvalitetne perinatalne medicinske njege. Međutim, perinatalni patološki događaji, od kojih je najčešća hipoksija, još uvijek uzrokuju značajne nedostatke u prijevremeno rođene djece koji mogu biti blagi do teški motorički, neurološki, kognitivni ili poremećaji u ponašanju. Neki od ovih blagih nedostataka najčešće se otkriju tek kada djeca krenu u školu jer tada ovi nedostaci počinju dolaziti do izražaja (143). Stoga, namjera je da ovaj model pruži nove uvide u području istraživanja perinatalnih ozljeda mozga i ranog otkrivanja blagih nedostataka.

U ovoj disertaciji istražen je učinak umjerene neinvazivne kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije u modelu štakora P1, što odgovara srednjem fetalnom periodu i ranom prijevremenom rođenju djece (23. – 32. tjedan). Detaljno su analizirane akutne, neposredne posljedice (acidobazni status, stanična i strukturna obilježja ozljede) takve hipoksije, kao i dugotrajne promjene u organizaciji ECM-a mozga (kvalitativne i kvantitativne promjene PNN-ova), PV neurona i njihove povezanosti u MCC-u, RSC-u i hipokampusu te promjene u ponašanju. Većina prethodnih studija bila je usmjerena na kombinirane HI ozljede ili tešku hipoksiju koje su redovito popraćene opsežnom upalnom reakcijom, nekrozom, gliozom, skarifikacijom te PVWMI-om praćenom značajnim motoričkim nedostacima (61). Međutim, modeli teške hipoksijske ili HI ozljede mozga ne mogu simulirati suptilne promjene i pojedinosti ranjivosti i plastičnosti zbog mnogo šireg opsega lezije koja zahvaća mnoge različite stanične populacije i razvojne procese istovremeno. U ovoj disertaciji prikazan je novi model umjerene neinvazivne kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije koji pokazuje kognitivna oštećenja i promjene u ponašanju, ali bez motoričkih nedostataka i značajnih oštećenja tkiva, upalnih ili glijalnih promjena u mozgu. Takav dizajn omogućio je dokaz odnosno demonstraciju hipotetskih histoloških i staničnih promjena koje utječu

na proliferaciju, migraciju i elongaciju aksona, sinaptogenezu, neuroprotekciju, sinaptičku plastičnost, reorganizaciju ECM-a, formiranje sklopova relevantnih za funkcije donošenja odluka, emocionalno učenje, pamćenje i vizualno-prostornu orijentaciju.

### **6.1. Neposredni učinak perinatalne hipoksije na acidobazni status i mikroglialne stanice u novorođenih štakora**

Neposredan, akutan učinak ove umjerene neinvazivne perinatalne generalizirane hipoksije u novorođenih štakora bio je povećanje laktata u krvi štakora P1. Povećana vrijednost laktata u cirkulaciji posljedica je anaerobnog metabolizma u svim tkivima s velikom potražnjom za kisikom i potvrđuje hipoksiju moždanog tkiva (144,145). Međutim, laktat se također smatra neuroprotektivnim čimbenikom zbog velike sposobnosti neonatalnog mozga da koristi laktat kao izvor energije. Ova se pretpostavka temelji na dva nalaza: I) višoj razini izražaja monokarboksilatnih prijenosnika i istodobno nižoj razini prijenosnika glukoze u usporedbi s odraslim mozgom (146–149); i II) metaboličkoj suradnji zvanoj laktatni pomak astrocit-neuron (engl. *astrocyte-neuron lactate shuttle*), tijekom koje astrociti glikolizom opskrbljuju neurone energijom (150,151). Modeli HI ozljede mozga dovoljno su ozbiljni da prouzroče trajne neuropatološke promjene koje su popraćene neuspješnom proizvodnjom energije. Glukoza je izvor energije kako za nezreli tako i za odrasli mozak, iako nezreli mozak također može iskoristiti ketonska tijela i laktat u prisutnosti kisika. Tijekom razdoblja hipoksije metabolizam glukoze se uglavnom odvija putem anaerobne glikoze s mliječnom kiselinom kao krajnjim proizvodom i uvelike reducira proizvodnju visokoenergetskog adenzin-trifosfata (ATP). Mjerenja koncentracije regionalne upotrebe glukoze (engl. *regional glucose utilization*, rCGU) u mozgu pokazala su i anaerobnu i oksidativnu upotrebu glukoze. Povećane vrijednosti rCGU zabilježene su u obe hemisfere od kojih je samo jedna trajno oštećena, što sugerira da kontralateralna hemisfera koja je hipoksijska, ali ne i ishemijska, može metabolizirati glukozu i anaerobno i oksidativno i proizvesti potrebnu količinu ATP-a, dok ipsilateralna hemisfera ne može. Svi glikolitički intermedijeri izuzev laktata bili su značajno sniženi u ipsilateralnoj hemisferi. Akumulacija laktata u mozgu, koja usko odgovara razini laktata u krvi, usporediva je u obje hemisfere. Međutim, omjer laktat/piruvat bio je 3 puta veći u HI tkivu, odražavajući znatno različita redoks stanja u dvije hemisfere. To je važno napomenuti jer intervencija kao što je terapijska hipotermija može spriječiti

sekundarni nedostatak energije. Taj nalaz je dosljedan sa smanjenom smrću stanica, kao što je pokazano i na velikim animalnim modelima (87).

Daljnji dokaz umjerene neinvazivne perinatalne hipoksije uočen je u razlikama u morfologiji i razmještaju mikroglijalne aktivnosti između hipoksijske i kontrolne skupine, osobito u CG-u i SVZ-u, najizraženije 24 sata nakon hipoksijske ozljede. U CG-u, kao i u SVZ-u, uočena je aktivirana mikroglija s jasnim grananjem staničnih nastavaka koji se protežu više od dva puta u promjeru staničnog tijela u hipoksijskoj skupini, u usporedbi sa srednjim tipom mikroglije nepravilnog oblika i kratkih, širokih, izbočenih izdanaka u kontrolnoj skupini. Izraženi su gusto zbijeni, zaobljeni i ameboidni makrofagi u CC-u u kontrolnoj i hipoksijskoj skupini. Istraživanje sazrijevanja mikroglije tijekom postnatalnog razvoja u štakora pokazalo je da je na P0 većina mikroglijalnih stanica u bijeloj tvari gusto zbijena, zaobljena i ameboidna; na P3 stanice razvijaju široke zupčaste izdanke, što dovodi do daljnjeg razvoja procesa na P7, i konačno, do smanjenja broja mikroglijalnih stanica koje se javlja na P14 (152). U ovom modelu, morfologija i broj makrofaga i mikroglijalnih stanica ukazuje na blagu mikroglijalnu aktivaciju vjerojatno izazvanu pojačanom potražnjom za fagocitozom i sanacijom oštećenih neurita i stanica. Mikroglijalna fagocitoza je temeljna za razvoj neurona i održavanje SŽS-a, imunološku obranu i reparaciju tkiva (153). Ameboidna mikroglija uglavnom je prisutna u bijeloj tvari, a osobito u CC-u tijekom perinatalnog razdoblja (152,154), što je također uočeno u CC-u ovog modela. Prerana aktivacija mikroglije zabilježena je kod PVWMI-a (155–157). Ipak, njihova je uloga još uvijek nejasna te ne znamo potiču li ozljedu tkiva ili imaju zaštitnu ulogu u PVWMI-u (128). Prisutnost aktiviranih mikroglijalnih stanica u bijeloj tvari ukazuje na to da ovaj tip upalnih stanica može doprinijeti perinatalnoj ozljedi mozga (158). Makrofagi pozitivni na CD68 koji se nalaze u SVZ-u uglavnom su fagocitni (92,148,149,152,153,159), a u ovom slučaju njihovo povećanje moglo bi ukazivati na povećanu fagocitnu aktivnost nakon umjerene hipoksijske perinatalne ozljede povezanu s poremećenom proliferacijom što dokazuje niža gustoća stanica u SVZ-i.

Mikroglija nastanjuje mozak prije rođenja i razlikuje se od perifernih monocita. Najnoviji podaci pokazuju da mikroglijalne stanice imaju ključnu ulogu u kontroli uklanjanja viška sinapsi (engl. *synaptic pruning*) i formiranju preciznih sinaptičkih krugova koji se javljaju tijekom prva 2 tjedna života glodavaca. Nepravilna komunikacija između mikroglije i neurona tijekom tog vremena i posljedične neprikladne sinaptičke veze mogu biti uzrok neurorazvojnih poremećaja.

Specifična mjesta povećanog nakupljanja ameboidne mikroglije nalaze se u ljudskom mozgu u razvoju, a prisutna su i u fetusu ovce tijekom razdoblja srednje gestacije u bijeloj tvari, regiji koja je osjetljiva na ozljede. Zbog njihovog aktivnog stanja tijekom ovog razvojnog stadija, mikroglijalne stanice mogu posebno pridonijeti nastanku ozljede bijele tvari u mozgu nedonoščadi. Nadalje, mikroglija može proizvesti toksične reaktivne oksidanse i na taj način ozlijediti nezreli mozak koji ima ograničenu antioksidacijsku obranu. Međutim, postoji sve više dokaza koji upućuju na zaštitnu ulogu mikroglije. U odrasloj dobi mikroglijalne stanice pružaju neuroprotektivne učinke stvaranjem faktora rasta, iako to još uvijek nije dokazano u mozgu u razvitku. Mikroglijalne stanice služe kao endogeni neuroprotektori kod neonatalnog arterijskog moždanog udara jer iscrpljivanje mikroglije uvelike pojačava ekscitotoksičnost, upalne reakcije i ozljede. Heterogenost mikroglijalnog bazena, vrijeme aktivacije i vrsta podražaja kritično utječu na niz mikroglijalnih učinaka (91). Bolje razumijevanje ovih događaja u mozgu u razvitku moći će se koristiti u razvoju nove zaštitne strategije u terapiji nedonoščadi.

## **6.2. Učinak perinatalne hipoksije na kvalitativne i kvantitativne promjene PNN-ova u zreloj moždanoj kori cingularne vijuge i hipokampusu**

Pokazalo se da ECM igra važnu ulogu u razvoju mozga te da je jedna od ključnih sastavnica prolaznih fetalnih struktura kao što su preteča sloja pod kortikalnom pločom, sloj pod kortikalnom pločom, marginalna zona, područja križanja rastućih aksonskih puteva, koji prethode uspostavljanju kortikalne laminacije i girifikacije te povezanosti u ljudskom mozgu (79–82). Perineuronske mreže, specijalizirani kondenzirani ECM, posebno su važne u sinaptogenezi, sazrijevanju i održavanju sinapsi te konačno u plastičnosti nakon ozljede (3,5,6,17,95,160–163). Nekoliko studija istraživalo je specifične promjene u PNN-ovima nakon teške HI ozljede kod odraslih životinja i pokazalo da HI ozljeda uzrokuje razgradnju PNN-ova u infarktним neokortikalnim područjima (47,164–166). Sinaptička plastičnost ovisna o iskustvu u odrasloj dobi posebno se oslanja na PNN-ove oko brzo-okidajućih PV neurona u mnogim područjima mozga (6,17), pokazujući specifične značajke tog područja (138,140,167) i ranjivost, što je vidljivo u različitim neurološkim i psihijatrijskim poremećajima (5,95,163,166).

Budući da se umjerena neinvazivna kontrolirana kratkotrajna perinatalna hipoksija u ovom modelu događa prije potpune diferencijacije ECM-a i PNN-ova, u ovoj disertaciji istraženo je utječe li

takva hipoksija na formiranje, broj i/ili razmještaj PNN-ova – bilo da takve potencijalne promjene nastaju kao posljedica ozljede, bilo da nastaju kao posljedica plastičnog odgovora. Također, cilj je bio utvrditi mogu li te promjene u organizaciji ECM-a u mozgu štakora, koji su bili podvrgnuti neinvazivnoj kontroliranoj kratkotrajnoj perinatalnoj hipoksiji, dovesti do kasnijih promjena u ponašanju i sposobnosti učenja, npr. u adolescenciji ili u odrasloj dobi.

Ova studija pokazala je kvalitativne razlike u morfologiji i razmještaju PNN-ova i PV neurona, uz značajno povećanje broja PNN/mm<sup>2</sup> i PV/mm<sup>2</sup> u životinja oba spola hipoksijske skupine, u područjima i poljima od interesa: MCC-u, RSC-u i hipokampusu. Brojni dokazi upućuju na to da prenatalna hipoksija u kritičnim razdobljima formiranja mozga rezultira značajnim promjenama u razvoju spoznajnih sposobnosti u različitim fazama postnatalnog života koje koreliraju s morfološkim promjenama moždanih struktura uključenih u učenje i pamćenje. Prenatalna hipoksija također dovodi do smanjenja potencijala prilagodbe i plastičnosti mozga zbog poremećaja u procesu sinapsi i širenju neuronskih podražaja, osobito u moždanoj kori i hipokampusu (95). Druge studije također su pokazale povećan broj PNN-ova nakon nedostatka sna i oksidativnog stresa u PV neuronima (168). PNN-ovi su neophodni za učenje straha i konsolidaciju sjećanja na strah povezanih sa slušnim znakovima u hipokampusu, u slušnoj moždanoj kori i u ACC-u (169,170). Također, pokazalo se da imaju važnu ulogu u razvoju sklonosti prema kokainu (oko Golgijevih stanica u malom mozgu (171) i nakon ponovljene primjene kokaina (172)). PNN-ovi štite neurone od oksidativnog stresa, što je prikazano u nekoliko studija (173–175), ali su istovremeno i osjetljivi na njega (174). Enzimsko uklanjanje PNN-ova povećava kognitivnu fleksibilnost potrebnu za obrnuto učenje prethodno stečenih navika ponašanja (176), a u jezgrama malog mozga rezultira boljim motoričko-asocijativnim učenjem (177,178). U hipokampusu, uklanjanje PNN-ova poništava nedostatke učenja (179). Budući da su ovom studijom pronađene promjene u organizaciji ECM-a, odnosno PNN-ovima u MCC-u, RSC-u i hipokampusu, vrijedi spomenuti da je pretpostavljena uloga MCC-a povezivanje ACC-a i RSC-a u relevantnom učenju odabirom različitih strategija učenja (52) te donošenje odluka i emocionalno učenje (53,54). Prostorna navigacija, učenje zadataka temeljenih na nagrađivanju, regulacija emocionalne reakcije na nove situacije (53,54,180,181) te pamćenje i učenje vizualnim znakovima (52–54) pripisuju se RSC-u. Hipokampus ima glavnu ulogu u učenju i pamćenju, odnosno u konsolidaciji pamćenja, jer

sudjeluje u formiranju dugotrajnog sjećanja pretvorbom kratkoročnih senzornih signala u dugotrajna ili trajno kodirana sjećanja (50,55,56).

### **6.3. Učinak perinatalne hipoksije na promjene u morfologiji, razmješčaju, broju i molekularnim sastavnicama PNN-ova – agrekanu, versikanu i neurokanu, u MCC-u i hipokampusu**

U ovoj studiji vidljive su promjene u morfologiji i razmješčaju molekularnih sastavnica PNN-ova – agrekana, versikana i neurokana između kontrolne i hipoksijske skupine. Perineuronske mreže, specijalizirani kondenzirani ECM, izgrađene su od CSPG-a zajedno s hijaluronanom, proteinima veze i tenascinom-R, koje pretežno obavijaju podskupinu GABA-ergičnih inhibicijskih interneurona u moždanoj kori i u hipokampusu (182). Slične strukture ECM-a nastaju perisinaptički oko inhibicijskih i ekscitacijskih sinapsi u neuropilu. Neuralni CSPG-i su agrekan, brevikan, neurokan, versikan i fosfakan. U mozgu sisavaca u početku se juvenilni oblik ECM-a sintetizira tijekom kasnog embrionalnog i ranog postnatalnog razvoja. Na primjer, neurokan i različite izoforme versikana (V0 i V1), kao i tenascin-C, istaknuti su sastojci ove juvenilne izvanstanične tvari, dok je odrasli ECM karakteriziran niskom regulacijom ovih sastavnica i pojačanom regulacijom drugih biljega uključujući brevikan, versikan izoforme V2, agrekan, kao i fosfakan i tenascin-R (25,32,41,183–185). Što se tiče staničnog podrijetla sastavnica PNN-ova, molekule koje su ključne za sklapanje PNN-ova, odnosno CSPG-i, vezni proteini i agrekan, sintetiziraju isključivo neuroni, dok astrociti, prekursori oligodendrocita i oligodendrociti proizvode druge molekule ECM-a, koje se tada vjerojatno ugrađuju u PNN-ove (38,183,186). Tijekom razvoja i u odrasloj dobi, ECM ima višestruke zadaće koje promiču sinaptičku plastičnost s jedne strane, a s druge strane održavaju homeostazu neuralnih puteva, što sugerira da ECM ima ključnu ulogu u patogenezi neuroloških i neuropsihijatrijskih poremećaja (43).

Agrekan je neophodan za stvaranje PNN-ova i sinaptičku povezanost (187–189). Kao i kod hijaluronana, svojstva lektikana (odnosno veličina molekula lektikana ili njihov profil glikozilacije) mogu utjecati na kompaktnost PNN-ova, a samim time i na funkcije PNN-ova. Na primjer, lektikan s većim afinitetom za TN-R (kao što je brevikan) mogao bi formirati više umreženih PNN-ova od onih s nižim afinitetom (19). Također, kod miševa s nedostatkom tenascina-R zabilježen je gubitak fosfakana i neurokana iz kortikalnih mreža (190).

CSPG-i su uključeni u sinaptičku plastičnost hipokampusa. Enzim koji specifično probavlja hondroitin sulfat je hondroitinaza ABC (engl. *chondroitinase ABC*, ChABC). Tretman s ChABC-om potpuno je ukinuo dugotrajnu potenciranost i oslabio dugotrajnu depresiju na sinapsama u poljima CA3-CA1 te uzrokovao značajno smanjenje ekscitabilnosti piramidnih neurona u polju CA1 (42,191). Također, tretman s ChABC-om dokazuje da brevikan i fosfakan utječu na ranu fazu dugotrajne potenciranosti, dok neurokan oblikuje kasnu dugotrajnu potenciranost. Uklanjanje CSPG-a može pomaknuti razvojni status nekoliko područja mozga u nezrelo i stoga nestabilnije i plastičnije stanje. CSPG-i također imaju važnu ulogu u učenju i pamćenju. Razine hipokampalnog brevikana i versikana u frakciji membrane bile su povećane u skupini štakora obučeni u zadatku prostorne navigacije koristeći MWM (55). Tretman s ChABC-om u moždanoj kori potaknuo je pamćenje uvjetovano prepoznavanjem, ali je učinak poboljšanja pamćenja nakon tretmana s ChABC-om kasnije oslabio, što sugerira da je regeneracija PNN-ova postupno obnavljala razine kontrolne plastičnosti (184,192).

Okoliš također može utjecati na izražaj CSPG-a u mozgu, što može biti korisno za učenje i pamćenje. Na primjer, smještaj miševa prije odvikavanja u obogaćenom okolišu, odnosno uvjeti smještaja laboratorijskih životinja koji olakšavaju pojačane senzorne, kognitivne, motoričke i socijalne stimulacije, značajno su poboljšali performanse MWM-a u odrasloj dobi te je povezano s ubrzanim formiranjem PNN-ova u strijatumu što sugerira da PNN-ovi mogu konsolidirati funkcionalno sazrijevanje neuronskih krugova uključenih u učenje (193). Stupanj učenja ptičjeg pjevanja kod zebrića također je povezan s postotkom PV neurona obavijenih PNN-ovima (194).

CSPG-i mogu pridonijeti nekim patološkim stanjima koja utječu na spoznajne sposobnosti u ljudi. Studija povezanosti na razini genoma otkrila je vezu između gena neurokana i bipolarnog poremećaja (195). Nadalje, alel rizika neurokana značajno je povezan s čimbenikom pretjerane aktivnosti (manije). Slično pacijentima, miševi s izbačenim neurokanom su hiperaktivni i pokazuju češće preuzimanje rizika i ponavljajuća ponašanja, manje ponašanja nalik depresiji, poremećenu inhibiciju prepulsa (fenomen u kojem slab podražaj (prepuls) može potisnuti reakciju zaprepaštenja na naknadni jači podražaj zaprepaštenja (puls)), preosjetljivost na amfetamin i povećanu preferenciju za saharin (196). Model Downova sindroma pokazao je narušeno prostorno učenje i pamćenje ovisno o hipokampusu u labirintu radijalnog kraka i značajno povećanje razine versikanske V2 izoforme u hipokampalnom sloju Or što korelira s brojem pogrešaka napravljenih



u testu (197). Također, u modelu adolescentnog uzimanja etanola, tretman alkoholom povezan je sa značajnim povećanjem izražaja nekoliko CSPG-a u orbitofrontalnoj moždanoj kori odraslih miševa, uključujući proteine koji vežu aglutinin (Wfa), brevikan i neurokan, kao i tenascin-C i hijaluronan (198). Perineuronske mreže imunoreaktivne na CSPG oko različitih tipova neurona otporne su na razaranje nakon trovanja štakora trimetiltinom u neposrednoj blizini aktivirane mikroglije u akutno oštećenim područjima mozga (199).

Nakon moždane ishemije zabilježena je pojačana regulacija sastavnica ECM-a, uključujući brevikan i tenascin, kao i površinski receptor CD44 za hijaluronan, što ukazuje na njihovu uključenost u reparaciju tkiva i reorganizaciju u periinfarktnom području (164,200). Povećani izražaj neurokana pokazan je u prolaznoj ishemiji retine (201). Osnovni događaj nakon ozljede SŽS-a je povećana regulacija glijalnih sastavnica ECM-a, posebno tenascina i versikana, neurokana i brevikana, što je također pokazano i nakon eksperimentalne ishemije (201–204). Moždani udar inducira izražaj CSPG-a koji inhibiraju rast u području glijalnog ožiljka, kao što su agrekan, fosfakan i versikan. *In vitro* studija pokazala je da neurokan inhibira rast neurita i taloženje na supstratu oko astrocita, ali ne i na površini stanice te ovi nalazi podupiru ulogu astrocita unutar područja glijalnog ožiljka kao izvora CSPG-a koji inhibiraju rast (165). Također, fokalna moždana ishemija inducira djelomično iscrpljivanje PNN-ova. Međutim, blaga hipoperfuzija koja nije povezana s ishemijskom ozljedom može potaknuti ultrastrukturna preuređenja u vizualno netaknutim PNN-ovima i potaknuti plastičnost neurona i ponovnu neuralnu povezanost nakon moždanog udara (205,206).

U ovoj studiji zabilježen je povećani izražaj agrekana i versikana u MCC-u i hipokampusu, s vidljivim razlikama u morfologiji i razmješčaju. Neurokan je u MCC-u kondenzirane, nježne mrežaste strukture, dok je u hipokampusu izražen daleko manje nego u MCC-u u obliku difuznog i kondenziranog ECM-a nježne, mrežaste morfologije. Ovi rezultati sugeriraju da umjerena neinvazivna kontrolirana kratkotrajna perinatalna hipoksija izaziva promjene u morfologiji i razmješčaju molekularnih sastavnica PNN-ova. Povećani izražaj agrekana, versikana i neurokana ukazuje na povećanu regulaciju glijalnih sastavnica ECM-a što ukazuje na ozljedu u SŽS-u i aktivnu ulogu CSPG-a u reparaciji tkiva. Povećani izražaj agrekana sugerira povećano stvaranje PNN-ova i sinaptičku povezanost što je pokazano u značajnom povećanju broja PNN/mm<sup>2</sup> u MCC-u, RSC-u i hipokampusu. Povećanje izražaja versikana u sloju Or hipokampusa može se povezati

s prolaznim učinkom sposobnosti učenja što je također prikazano u ovoj studiji. Poremećen razmještaj neurokana u MCC-u povezan je s nalazom hiperaktivnosti u hipoksijskih štakora.

#### **6.4. Povezanost promjena PNN-ova nastalih nakon perinatalne hipoksije s odstupanjima u lokomotornoj aktivnosti i spoznajnim sposobnostima**

U ovom istraživanju umjerena neinvazivna kontrolirana kratkotrajna perinatalna hipoksija različito utječe na tri od četiri glavna segmenta ponašanja koja su promatrana u ovoj studiji. Lokomotorna aktivnost je trajno i značajno povećana i u mladoj i u odrasloj dobi štakora oba spola hipoksijske skupine. Istraživačko ponašanje značajno je promijenjeno u hipoksijskih mužjaka u mladoj dobi, dok je trajno i značajno promijenjeno kod hipoksijskih ženki. Nije zabilježen učinak umjerene neinvazivne perinatalne hipoksije na anksiozno ponašanje, ali je hipoksija izazvala spolno specifičan prolazni učinak na sposobnost učenja odnosno na prostorno pamćenje, pri čemu je broj točnih odabira u T-labirintu značajno smanjen u mladim hipoksijskih mužjaka u usporedbi s kontrolnim mužjacima.

Ovi rezultati sugeriraju da neonatalna hipoksija izaziva dugotrajnu hiperaktivnost bez utjecaja na razinu anksioznosti. Većina istraživanja u svom dizajnu koristila je samo jedan spol laboratorijskih životinja unutar iste skupine što je onemogućilo bitno saznanje o spolno specifičnom utjecaju hipoksije na spol. Nasuprot tome, u ovom radu je pokazano da je značajna hiperaktivnost bila prolazna za hipoksijske mužjake, dok su hipoksijske ženke ostale jednako hiperaktivne i u odrasloj dobi što sugerira da su one ranjivije na hipoksijsku ozljedu. Dodatni rezultati koji podupiru tvrdnju da su ženke osjetljivije na hipoksijsku ozljedu su rezultati testa društvenog odabira koji je pokazao da hipoksija umanjuje ili čak poništava spolne razlike u društvenosti koje su u početku postojale.

Hiperaktivnost, koja se mjeri povećanim kretanjem i/ili povećanim propinjanjem (engl. *rearing*) životinje, zabilježena je u mladim štakora izloženih postnatalnoj intermitentnoj hipoksiji u dobi P7-P10 (207,208). Također je zabilježena i nakon blage kronične hipoksije u dobi P10 (209) te nakon neonatalne anoksije (61,210–215), kao i nedostaci kratkoročnog pamćenja (216). Druga istraživanja, koja uključuju teške HI ozljede, opisala su nedostatke prostornog učenja (104) i oslabljen rad u memoriji (217). Studija koja je uspoređivala utjecaj HI ozljede izazvane u dobi P1, P3 i P7 pokazala je da su nedostaci brze slušne obrade (engl. *rapid auditory processing* – RAP)

prisutni samo u mlađoj dobi, ali ne i u odrasloj dobi za P1 i P3. Robusni nedostaci pažnje prisutni su i u odrasloj dobi kada je HI ozljeda napravljena na P3, dok su životinje P7 pokazale trajne nedostatke u RAP-u i prostornom učenju/pamćenju tijekom odrasle dobi (108,218). Uz prolaznu hiperaktivnost (210,211,213), dugotrajni poremećaji u učenju smatraju se jednim od obilježja hipoksije kod mladih (210,219) i odraslih štakora (207,209,213,214,220), što je također potvrđeno u ovoj studiji.

Na temelju rezultata ove studije pretpostavlja se da je povećanje broja PNN-ova i PV neurona jedan od mogućih uzroka ograničene sinaptičke plastičnosti u zreloj moždanoj kori cingularne vijuge i hipokampusu, hiperaktivnosti i ograničene kognitivne funkcije u ovom modelu. Odnosno, razvojno promijenjena formacija PNN-sinapse, koja je povezana sa specifičnom populacijom neurona, ističe lezije koje utječu na funkciju povezivanja koje su vidljive u promjeni ponašanja. U svom izraženijem obliku razvojno poremećena povezanost vezana uz PNN-ove može biti uzrok kognitivnih poremećaja ili poremećaja ponašanja, kao npr. shizofrenija, bipolarni poremećaj, teška depresija ili spektra autizma.

Vrlo malo dostupnih istraživanja istražuje utjecaj samo hipoksije na mozak u razvitku. Također, još je manje studija koje istražuju njen dugoročni učinak na histološkoj razini. Utjecaj hipoksijske ozljede na broj PNN-ova u štakorskom mozgu do sada nije istraživan. Studije koje istražuju utjecaj hipoksijske ozljede na ishod ponašanja su oskudne i obuhvaćaju samo određene aspekte promjena u ponašanju koristeći standardne testove prostornog pamćenja i lokomotornog ponašanja. Uz to, većina studija obuhvaća samo istraživanje na mužjacima. Ovo istraživanje omogućuje bolje razumijevanje odnosa histološkog supstrata (izvanstaničnih i staničnih biljega) i mehanizama oštećenja perinatalnog razvoja mozga nakon neinvazivne kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije koji uključuju promjene u morfologiji, razmještanju, molekularnim sastavnicama i broju PNN-ova kao i njihovu povezanost s lokomotornim, istraživačkim, anksioznim i kognitivnim obrascima ponašanja u oba spola. Također, ovo istraživanje pruža nove spoznaje o fetalnom i perinatalnom oštećenju mozga u animalnim modelima, a u svrhu komparativnih i translacijskih istraživanja mehanizama oštećenja fetalnog i perinatalnog mozga u čovjeka.

Obzirom da je u ovom istraživanju korišten novi model perinatalne hipoksijske ozljede mozga koji do sada nije opisan, interpretacija dobivenih rezultata predstavlja izazov. Postoji jako veliki broj

istraživanja HI ozljede mozga koja koriste Rice-Vannuccijev model i njegove modifikacije, dok je istraživanje samo hipoksijske ozljede oskudno. Također, u mnogim istraživanjima dob mladunaca štakora kod HI ili samo hipoksijske ozljede je najčešće P7 što nije usporedivo s ovim modelom. Zbog toga dobiveni rezultati predstavljaju značajan doprinos u istraživanju hipoksijske ozljede mozga. U ovom istraživanju korištena je specifična dob štakora P1 koja je približno istovjetna razdoblju od 23. do 32. tjedna gestacije. Obzirom da je većina studija promatrala razvoj mikroglije nakon HI ozljede, ali u kasnijoj dobi (P3 najčešće), dobiveni rezultati izvanstaničnog i staničnog supstrata hipoksijske ozljede u ovoj studiji predstavljaju značajan doprinos u razumijevanju patogeneze hipoksijske ozljede koja se može primijeniti i na ljudski mozak u razvitku. Također, mjerenje acidobaznog statusa prema dostupnoj literaturi do sada je rađeno samo na miševima te mjerenja na P1 štakoru korištenom u ovom istraživanju predstavljaju značajan doprinos razumijevanju biokemijske podloge nastanka hipoksijske ozljede. Isto tako, PNN-ovi i njihov regionalni razmještaj te kolokalizacija oko PV neurona istraženi su samo na miševima u odrasloj dobi, ali nakon normotipičnog razvitka. Istraživanja PNN-ova i njihovih molekularnih sastavnica te kolokalizacija oko PV neurona nakon hipoksijske ozljede prema dostupnoj literaturi nisu istraženi. Rezultati ove studije daju značajan doprinos o važnosti ECM-a, njegovih difuznih i kondenziranih oblika i njegovoj funkciji nakon hipoksijske ozljede. U ovom istraživanju korišteni su standardni testovi ponašanja koji pružaju nova saznanja o promjeni obrazaca ponašanja u štakora oba spola nakon hipoksijske ozljede. Zbog svega navedenog, uspostavljanje novog animalnog modela kontrolirane kratkotrajne perinatalne hipoksije u štakora koji bi pružao do sada neistražene aspekte predstavljao je veliki izazov. Jednako tako interpretacija dobivenih rezultata predstavlja još veći izazov zbog nemogućnosti oslanjanja na dosadašnja istovjetna istraživanja.

Očekuje se da će daljnja istraživanja na ovom modelu pružiti nove eksperimentalne mogućnosti i uvid u moguće preventivne i terapijske postupke za liječenje posljedica hipoksijskog oštećenja mozga u usporednim i translacijskim studijama na ljudima. Buduća istraživanja svakako bi trebala obuhvaćati MRI snimanje u kontrolnih i hipoksijskih štakora kroz duži vremenski period jer MRI ima najveću kliničku osjetljivost i specifičnost procjene promjena u mijelinu na neinvazivan način. Tako bismo dobili važne informacije o nastanku hipoksijske ozljede, većoj ili manjoj regionalnoj osjetljivosti kao i specifičnosti vezane za spol. Nadalje, poznato je da se PNN-ovi u štakora počinju formirati u dobi P13. Zbog toga bi buduća istraživanja trebala obuhvaćati raniji period istraživanja

broja, molekularnih sastavnica i regionalni razmještaj PNN-ova kako bi se utvrdilo u kojem točno periodu nastaje značajno povećani broj PNN-ova koji je vidljiv u odrasloj dobi. Bilo bi poželjno odgovoriti na pitanja dolazi li do prekomjernog nastanka PNN-ova odmah u početku formiranja kondenziranog ECM-a ili možda u adolescentnoj dobi. Također, je li neka sastavnica PNN-ova (agrekan, versikan, neurokan, brevikan) odgovorna za povećanje broja PNN-ova ili možda povećano stvaranje veznih proteina kao što su HAPLN1 i HAPLN4 ili glikoproteina tenascina-R ili semaforina 3A ili transkripcijskog čimbenika OTX2. Obzirom da prilikom hipoksije dolazi i do upalnog odgovora tkiva trebalo bi detaljnije istražiti u više vremenskih točaka prekursore oligodendrocita, astrocite, citokine kao što su interleukini, kao i transkripcijske faktore bitne za nastanak hipoksije. Također, bilo bi zanimljivo vidjeti neurobihevioralni razvoj mladunčadi štakora nakon hipoksijske ozljede koristeći standardizirane testove ponašanja primjerene za tu dob, moguće promjene u refleksima ili ranom tjelesnom razvoju životinja. Isto tako, neke studije pokazuju da obogaćivanje okoliša i veća briga oko mladunaca u ranoj dobi ima pozitivan učinak na razvitak štakora te rezultira boljim rezultatima u testovima ponašanja. Zbog toga bilo bi zanimljivo vidjeti utječe li briga za mladunce štakora u ranoj dobi, koja uključuje više fizičkog kontakta, hranjenje, interakciju između štakora i istraživača, ali i obogaćivanje okoliša s uvođenjem raznih interaktivnih predmeta prilagođenih vrsti i dobi životinje, na bolji oporavak nakon hipoksijske ozljede. Obzirom da je u ovoj studiji prikazan prolazni učinak hipoksije na sposobnost učenja odnosno na prostorno pamćenje, bilo bi dobro u slijedećoj fazi istraživanja koristiti testove ponašanja koji na još specifičniji način određuju nedostatke u formiranju memorije, kratkoročnom ili dugoročnom pamćenju. Primjerice, MWM test i Barnesov labirint za prostorno učenje i memoriju, Y-labirint za mjerenje kratkoročnog prostornog pamćenja i test radijalnog labirinta s osam krakova za procjenu pamćenja i prostornog učenja. Isto tako, bilo bi dobro koristiti i testove ponašanja koji istovremeno uključuju i kognitivne, motoričke, vizualno-prostorne i vremenske funkcije za postizanje određenih ciljeva kao što je npr. test u kojem štakori mogu naučiti voziti specijalno dizajnirano vozilo kojim upravljaju glodavci (engl. *rodent operated vehicle*, ROV). Dobiveni rezultati značajno bi doprinijeli boljem shvaćanju nastanka hipoksijske ozljede te definiranju terapijskih metoda za ublažavanje ili liječenje hipoksijske ozljede u nedonoščadi.

## 7. ZAKLJUČAK

1. Detaljna kvalitativna i kvantitativna analiza PNN-ova u mozgu štakora odrasle dobi u područjima i poljima od interesa – MCC-u i hipokampusu otkrila je razlike u morfologiji, razmještaju te u broju PNN/mm<sup>2</sup> između hipoksijske i kontrolne skupine. Te razlike uočene su i kod ženki i kod mužjaka. Hipoksijske ženke i hipoksijski mužjaci imaju značajno veći broj PNN/mm<sup>2</sup> od kontrolnih ženki i mužjaka u MCC-u. Također, hipoksijske ženke imaju značajno veći broj PNN/mm<sup>2</sup> od kontrolnih ženki u polju CA1.
2. Tijekom normotipičnog perinatalnog razvitka mozga Wistar Han štakora (kontrolna skupina) oba spola, morfologija PNN-ova je slijedeća: PNN-ovi su malobrojniji, slabije Wfa-pozitivni, tvore nježni, mrežasti omotač i prvenstveno se nalaze oko tijela neurona i proksimalnih dendrita. Molekularne sastavnice PNN-ova (agrekan, versikan, neurokan) diferencijalno su izražene u svim slojevima MCC-a i poljima hipokampusa.
3. Kontrolirana kratkotrajna perinatalna hipoksija uzrokovala je promjene u morfologiji, razmještaju i broju PNN-ova u MCC-u i hipokampusu u mozgu Wistar Han štakora oba spola. U hipoksijskoj skupini PNN-ovi su brojniji s intenzivnijim Wfa-obojeanjem što govori o kondenziranosti ECM-a oko tijela neurona, proksimalnih i bazalnih dendrita, a često i oko početnog segmenta aksona. Najveća razlika u broju i morfologiji PNN-ova između hipoksijske i kontrolne skupine vidljiva je u slojevima II/III i V MCC-a te u sloju LMol u poljima CA1, CA2 i CA3. Izražaj molekularnih sastavnica perineuronskih mreža (agrekan, versikan, neurokan) je viši u svim slojevima MCC-a i poljima hipokampusa u usporedbi s kontrolnom skupinom.
4. Izvanstanični i stanični supstrat hipoksijske ozljede u mozgu novorođenih Wistar Han štakora oba spola ukazuje na pomak s aerobnog na anaerobno metaboličko stanje u tkivu kao posljedicu hipoksije te na promjenu morfologije mikroglijalnih stanica koja potvrđuje da su proliferacijske zone zahvaćene ozljedom kao i ograničenu aktivaciju mikroglijalnih stanica u hipoksijskih štakora.
5. Razvojno promijenjen broj PNN-ova i sinapsi (povećanje broja PNN/mm<sup>2</sup>) jedan je od mogućih uzroka dugotrajne hiperaktivnosti, značajne promjene istraživačkog ponašanja i prolaznog učinka na sposobnost učenja odnosno na prostorno pamćenje. U mladoj dobi hipoksijske ženke i hipoksijski mužjaci značajno su aktivniji i značajno sporije uče u usporedbi s kontrolnim ženkama

i mužjacima, a istraživačko ponašanje je značajno promijenjeno u hipoksijskih mužjaka. U odrasloj dobi hipoksijske ženke značajno su aktivnije od kontrolnih ženki te je prisutan sporiji tempo učenja u oba spola, koji je izraženiji u hipoksijskih mužjaka u usporedbi s kontrolnim mužjacima. Rezultati testiranja ponašanja detaljno su opisani u objavljenom radu: Trnski *i sur.* 2022. (129) koji se nalazi na kraju ovog doktorskog rada.

## 8. SAŽETAK

PNN-ovi predstavljaju kondenzirani ECM koji obavija tijela neurona, proksimalne i srednje dendrite te početni aksonski segment. Imaju važnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti. Cilj ovoga rada je opisati kvalitativne i kvantitativne promjene PNN-ova u mozgu štakora odrasle dobi nakon perinatalne hipoksije, opisati izvanstanični i stanični supstrat hipoksijske ozljede te usporednom analizom odrediti korelaciju promjena PNN-ova i odstupanja u motorici i spoznajnim sposobnostima. IHC i IF metodama uočena je promijenjena morfologija Iba-1-imunoreaktivne mikroglije u CG-u i SVZ-i u tek rođenih životinja (24 sata nakon perinatalne hipoksije) te razlike u morfologiji, razmještau i sastavu PNN-ova u područjima i poljima od interesa – MCC-u i hipokampusu u odraslih životinja. Kvantitativnom analizom uočen je značajan porast broja PNN/mm<sup>2</sup> u hipoksijskoj skupini u usporedbi s kontrolnom. Testiranje ponašanja pokazalo je značajnu hiperaktivnost i sporiji tempo učenja u hipoksijskih štakora. Temeljem rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da perinatalna hipoksija uzrokuje promjene u morfologiji, broju i sastavu perineuronskih mreža, a njihov povećani broj vjerojatno doprinosi uočenoj dugotrajnoj hiperaktivnosti sa značajnim promjenama istraživačkog ponašanja i prolazni učinak na prostorno pamćenje.



## 9. SUMMARY

### **Changes of perineuronal nets in the rat brain after controlled short-term perinatal hypoxia**

*Sara Trnski, DVM, 2022*

PNNs are condensed forms of the ECM that envelop neuronal bodies, proximal and middle dendrites, and the initial axonal segment. They play an essential role in synaptic plasticity. The objectives of this study are: to describe qualitative and quantitative changes in PNNs in the brain of adult rats after perinatal hypoxia, to determine the extracellular and cellular substrate of hypoxic injury, and to make a comparative analysis of changes in PNNs to explain possible deviations in motor skills and cognitive abilities. IHC and IF showed altered morphology of Iba-1-immunoreactive microglia in CG and SVZ in newborns (24 hours after perinatal hypoxia) and differences in the morphology, distribution, and composition of PNNs in regions and fields of interest - MCC and hippocampus in adult animals. Quantitative analysis revealed a significant increase in the number of PNN/mm<sup>2</sup> in the hypoxia group. Behavioral testing revealed significant hyperactivity and a slower pace of learning in hypoxia rats. In conclusion, perinatal hypoxia causes changes in morphology, number, and composition of PNNs that might be the cause for transient effect on spatial memory, and background of long-term hyperactivity and significant changes in research behavior.

## 10. POPIS LITERATURE

1. Golgi C. Intorno alla struttura delle cellule nervose. Boll della Soc Med Chir di Pavia. 1898;13(Tavola Xxxvii):3–16.
2. Celio MR, Spreafico R, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L. Perineuronal nets: Past and present. Trends Neurosci. 1998;21(12):510–5.
3. Shen HH. Perineuronal nets gain prominence for their role in learning, memory, and plasticity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(40):9813–5.
4. Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. Science. 2002;298(5596):1248–51.
5. Fawcett JW, Oohashi T, Pizzorusso T. The roles of perineuronal nets and the perinodal extracellular matrix in neuronal function. Nat Rev Neurosci. 2019;20(8):451–65.
6. Sorg BA, Berretta S, Blacktop JM, Fawcett JW, Kitagawa H, Kwok JCF *i sur*. Casting a Wide Net: Role of Perineuronal Nets in Neural Plasticity. J Neurosci. 2016;36(45):11459–68.
7. Zhou Y, Danbolt NC. GABA and glutamate transporters in brain. Front Endocrinol. 2013;4:1–14.
8. Deidda G, Bozarth IF, Cancedda L. Modulation of GABAergic transmission in development and neurodevelopmental disorders: Investigating physiology and pathology to gain therapeutic perspectives. Front Cell Neurosci. 2014;8:1–23.
9. Bitanhirwe BKY, Woo TUW. Perineuronal nets and schizophrenia: The importance of neuronal coatings. Neurosci Biobehav Rev. 2014;45:85–99.
10. Blosa M, Sonntag M, Brückner G, Jäger C, Seeger G, Matthews RT *i sur*. Unique features of extracellular matrix in the mouse medial nucleus of trapezoid body – Implications for physiological functions. Neuroscience. 2013;228:215–34.
11. Defelipe J, López-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Bielza C, Larrañaga P, Anderson S *i sur*. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. Nat Rev Neurosci. 2013;14(3):202–16.

12. Rudy B, Fishell G, Lee SH, Hjerling-Leffler J. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol.* 2011;71(1):45–61.
13. Gandal MJ, Nesbitt AM, McCurdy RM, Alter MD. Measuring the maturity of the fast-spiking interneuron transcriptional program in autism, schizophrenia, and bipolar disorder. *PLoS One.* 2012;7(8):1–8.
14. Filice F, Vörckel KJ, Sungur AÖ, Wöhr M, Schwaller B. Reduction in parvalbumin expression not loss of the parvalbumin-expressing GABA interneuron subpopulation in genetic parvalbumin and shank mouse models of autism. *Mol Brain.* 2016;9(1):1–17.
15. Hashemi E, Ariza J, Rogers H, Noctor SC, Martínez-cerdeño V. The number of parvalbumin-expressing interneurons is decreased in the prefrontal cortex in autism. *Cereb Cortex.* 2017;27(3):1931–43.
16. Vogt D, Cho KKA, Shelton SM, Paul A, Huang ZJ, Sohal VS *i sur.* Mouse *Cntnap2* and Human *CNTNAP2* ASD Alleles Cell Autonomously Regulate PV + Cortical Interneurons. *Cereb Cortex.* 2018;28(11):3868–79.
17. Wang D, Fawcett J. The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res.* 2012;349(1):147–60.
18. Slaker ML, Harkness JH, Sorg BA. A standardized and automated method of perineuronal net analysis using *Wisteria floribunda* agglutinin staining intensity. *IBRO Reports.* 2016;1:54–60.
19. Yamaguchi Y. Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(2):276–89.
20. Miyata S, Nadanaka S, Igarashi M, Kitagawa H. Structural Variation of Chondroitin Sulfate Chains Contributes to the Molecular Heterogeneity of Perineuronal Nets. *Front Integr Neurosci.* 2018;12(3):1–12.
21. Dauth S, Grevesse T, Pantazopoulos H, Campbell PH, Maoz BM, Berretta S *i sur.* Extracellular matrix protein expression is brain region dependent. *J Comp Neurol.* 2016;524(7):1309–36.

22. Miao QL, Ye Q, Zhang XH. Perineuronal net, CSPG receptor and their regulation of neural plasticity. *Sheng Li Xue Bao*. 2014;66(4):387–97.
23. Kwok JCF, Warren P, Fawcett JW. Chondroitin sulfate: A key molecule in the brain matrix. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(4):582–6.
24. Carulli D, Pizzorusso T, Kwok JCF, Putignano E, Poli A, Forostyak S *i sur*. Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain*. 2010;133(8):2331–47.
25. Bekku Y, Saito M, Moser M, Fuchigami M, Maehara A, Nakayama M *i sur*. Bral2 is indispensable for the proper localization of brevican and the structural integrity of the perineuronal net in the brainstem and cerebellum. *J Comp Neurol*. 2012;520(8):1721–36.
26. Hagihara K, Miura R, Kosaki R, Berglund E, Ranscht B, Yamaguchi Y. Immunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. *J Comp Neurol*. 1999;410(2):256–64.
27. Bekku Y, Su W-D, Hirakawa S, Fässler R, Ohtsuka A, Kang JS *i sur*. Molecular cloning of Bral2, a novel brain-specific link protein, and immunohistochemical colocalization with brevican in perineuronal nets. *Mol Cell Neurosci*. 2003;24(1):148–59.
28. Aspberg A, Miura R, Bourdoulous S, Shimonaka M, Heinegård D, Schachner M *i sur*. The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(19):10116–21.
29. Bonci A, Lupica CR, Morales M. NgR1 and NgR3 are receptors. *Nat Neurosci*. 2015;15(5):703–12.
30. Kwok JCF, Foscarin S, Fawcett JW. Perineuronal Nets: A Special Structure in the Central Nervous System Extracellular Matrix. U: Leach, J, Powell, E, ur. *Extracellular Matrix*. New York:Humana Press; 2015, str. 23–32.

31. Miyata S, Kitagawa H. Formation and remodeling of the brain extracellular matrix in neural plasticity: Roles of chondroitin sulfate and hyaluronan. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2017;1861(10):2420–34.
32. Galtrey CM, Kwok JCF, Carulli D, Rhodes KE, Fawcett JW. Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci*. 2008;27(6):1373–90.
33. Matthews RT, Kelly GM, Zerillo CA, Gray G, Tiemeyer M, Hockfield S. Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2002;22(17):7536–47.
34. Brückner G, Szeöke S, Pavlica S, Grosche J, Kacza J. Axon initial segment ensheathed by extracellular matrix in perineuronal nets. *Neuroscience*. 2006;138(2):365–75.
35. John N, Krügel H, Frischknecht R, Smalla KH, Schultz C, Kreutz MR *i sur*. Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures. *Mol Cell Neurosci*. 2006;31(4):774–84.
36. Bekku Y, Oohashi T. Neurocan contributes to the molecular heterogeneity of the perinodal ECM. *Arch Histol Cytol*. 2011;73(2):95–102.
37. Brückner G, Morawski M, Arendt T. Aggrecan-based extracellular matrix is an integral part of the human basal ganglia circuit. *Neuroscience*. 2008;151(2):489–504.
38. Oohashi T, Edamatsu M, Bekku Y, Carulli D. The hyaluronan and proteoglycan link proteins: Organizers of the brain extracellular matrix and key molecules for neuronal function and plasticity. *Exp Neurol*. 2015;274:134–44.
39. Geissler M, Gottschling C, Aguado A, Rauch U, Wetzel CH, Hatt H *i sur*. Primary hippocampal neurons, which lack four crucial extracellular matrix molecules, display abnormalities of synaptic structure and function and severe deficits in perineuronal net formation. *J Neurosci*. 2013;33(18):7742–55.
40. De Luca C, Papa M. Looking Inside the Matrix: Perineuronal Nets in Plasticity, Maladaptive Plasticity and Neurological Disorders. *Neurochem Res*. 2016;41(7):1507–15.

41. Gundelfinger ED, Frischknecht R, Choquet D, Heine M. Converting juvenile into adult plasticity: A role for the brain's extracellular matrix. *Eur J Neurosci.* 2010;31(12):2156–65.
42. Senkov O, Andjus P, Radenovic L, Soriano E, Dityatev A. Chapter 3 - Neural ECM molecules in synaptic plasticity, learning, and memory. U: Dityatev A, Wehrle-Haller B, Pitkänen A, ur. *Brain Extracellular Matrix in Health and Disease.* Elsevier; 2014, str. 53–80.
43. Dityatev A, Schachner M, Sonderegger P. The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11(11):735–46.
44. Quattromani MJ, Pruvost M, Guerreiro C, Backlund F, Englund E, Aspberg A *i sur.* Extracellular Matrix Modulation Is Driven by Experience-Dependent Plasticity During Stroke Recovery. *Mol Neurobiol.* 2018;55(3):2196–213.
45. Berretta S, Pantazopoulos H, Markota M, Brown C, Batzianouli ET. Losing the sugar coating: Potential impact of perineuronal net abnormalities on interneurons in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2015;167(1–3):18–27.
46. Vogt BA. Chapter 21 - Cingulate Cortex and Pain Architecture. U: Paxinos G, ur. *The Rat Nervous System.* 4. izd. San Diego:Academic Press; 2015, str. 575–99.
47. Härtig W, Mages B, Aleithe S, Nitzsche B, Altmann S, Barthel H *i sur.* Damaged Neocortical Perineuronal Nets Due to Experimental Focal Cerebral Ischemia in Mice, Rats and Sheep. *Front Integr Neurosci.* 2017;11(15):1–16.
48. Martín-de-Saavedra MD, del Barrio L, Cañas N, Egea J, Lorrio S, Montell E *i sur.* Chondroitin sulfate reduces cell death of rat hippocampal slices subjected to oxygen and glucose deprivation by inhibiting p38, NFκB and iNOS. *Neurochem Int.* 2011;58(6):676–83.
49. Stolp HB, Fleiss B, Arai Y, Supramaniam V, Vontell R, Birtles S *i sur.* Interneuron development is disrupted in preterm brains with diffuse white matter injury: Observations in mouse and human. *Front Physiol.* 2019;10:955–71.
50. Cappaert NLM, Van Strien NM, Witter MP. Chapter 20 - Hippocampal Formation. U: Paxinos G, ur. *The Rat Nervous System.* 4. izd. San Diego:Academic Press; 2015, str. 511–73.

51. Vogt BA, Vogt L, Farber NB. Chapter 22 - Cingulate Cortex and Disease Models. U: Paxinos G, ur. *The Rat Nervous System*. 3. izd. Burlington:Academic Press; 2004, str. 705–27.
52. Vogt BA, Paxinos G. Cytoarchitecture of mouse and rat cingulate cortex with human homologies. *Brain Struct Funct*. 2014;219(1):185–92.
53. Lukoyanov N V, Lukoyanova EA. Retrosplenial cortex lesions impair acquisition of active avoidance while sparing fear-based emotional memory. *Behav Brain Res*. 2006;173(2):229–36.
54. Vann SD, Aggleton JP. Selective dysgranular retrosplenial cortex lesions in rats disrupt allocentric performance of the radial-arm maze task. *Behav Neurosci*. 2005;119(6):1682–6.
55. Saroja SR, Sase A, Kircher SG, Wan J, Berger J, Höger H *i sur*. Hippocampal proteoglycans brevican and versican are linked to spatial memory of Sprague-Dawley rats in the morris water maze. *J Neurochem*. 2014;130(6):797–804.
56. Sweatt JD. Chapter 6 - Hippocampal Function in Cognition. U: Sweatt JD, ur. *Mechanisms of Memory*. 2. izd. London:Academic Press; 2010, str. 128–49.
57. Gopagondanahalli KR, Li J, Fahey MC, Hunt RW, Jenkin G, Miller SL *i sur*. Preterm hypoxic-ischemic encephalopathy. *Front Pediatr*. 2016;4:1–10.
58. Volpe JJ. Neonatal encephalopathy: An inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ann Neurol*. 2012;72(2):156–66.
59. Vohr BR. Neurodevelopmental Outcomes of Extremely Preterm Infants. *Clin Perinatol*. 2014;41(1):241–55.
60. Laptook AR. Birth Asphyxia and Hypoxic-Ischemic Brain Injury in the Preterm Infant. *Clin Perinatol*. 2016;43(3):529–45.
61. Millar LJ, Shi L, Hoerder-Suabedissen A, Molnár Z. Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:1–36.
62. Vanes LD, Hadaya L, Kanel D, Falconer S, Ball G, Batalle D *i sur*. Associations Between Neonatal Brain Structure, the Home Environment, and Childhood Outcomes Following Very Preterm Birth. *Biol Psychiatry Glob Open Sci*. 2021;1(2):146–55.

63. Badr (Zahr) LK, Purdy I. Brain Injury in the Infant. *J Perinat Neonatal Nurs.* 2006;20(2):176–7.
64. Ferriero DM. Neonatal Brain Injury. *N Engl J Med.* 2004;351(19):1985–95.
65. Nelson KB, Chang T. Is cerebral palsy preventable? *Curr Opin Neurol.* 2008;21(2):129–35.
66. Johnson S, Marlow N. Preterm birth and childhood psychiatric disorders. *Pediatr Res.* 2011;69(5):22–8.
67. Franz AP, Bolat GU, Bolat H, Matijasevich A, Santos IS, Silveira RC *i sur.* Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Very Preterm/Very Low Birth Weight: A Meta-analysis. *Pediatrics.* 2018;141(1):e20171645.
68. Reiss JD, Peterson LS, Nesamoney SN, Chang AL, Pasca AM, Marić I *i sur.* Perinatal infection, inflammation, preterm birth, and brain injury: A review with proposals for future investigations. *Exp Neurol.* 2022;351:113988.
69. Jisa KA, Clarey DD, Peeples ES. Magnetic Resonance Imaging Findings of Term and Preterm Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Review of Relevant Animal Models and Correlation to Human Imaging. *Open Neuroimag J.* 2018;12(1):55–65.
70. Clowry GJ, Basuodan R, Chan F. What are the Best Animal Models for Testing Early Intervention in Cerebral Palsy? *Front Neurol.* 2014;5:258.
71. Liu X-B, Shen Y, Plane JM, Deng W. Vulnerability of premyelinating oligodendrocytes to white-matter damage in neonatal brain injury. *Neurosci Bull.* 2013;29(2):229–38.
72. Leviton A, Gressens P. Neuronal damage accompanies perinatal white-matter damage. *Trends Neurosci.* 2007;30(9):473–8.
73. Leviton A, Gressens P, Wolkenhauer O, Dammann O. Systems approach to the study of brain damage in the very preterm newborn. *Front Syst Neurosci.* 2015;9:1–12.
74. McQuillen PS, Sheldon RA, Shatz CJ, Ferriero DM. Selective vulnerability of subplate neurons after early neonatal hypoxia-ischemia. *J Neurosci.* 2003;23(8):3308–15.



75. Molnár Z, Luhmann HJ, Kanold PO. Transient cortical circuits match spontaneous and sensory-driven activity during development. *Science*. 2020;370(6514):eabb2153.
76. Ferguson BR, Gao WJ. Pv interneurons: critical regulators of E/I balance for prefrontal cortex-dependent behavior and psychiatric disorders. *Front Neural Circuits*. 2018;12:1–13.
77. Sekeljic V, Bataveljic D, Stamenkovic S, Ułamek M, Jabłoński M, Radenovic L *i sur*. Cellular markers of neuroinflammation and neurogenesis after ischemic brain injury in the long-term survival rat model. *Brain Struct Funct*. 2012;217(2):411–20.
78. Radenovic L, Nenadic M, Ułamek-Kozioł M, Januszewski S, Czuczwar SJ, Andjus PR *i sur*. Heterogeneity in brain distribution of activated microglia and astrocytes in a rat ischemic model of Alzheimer’s disease after 2 years of survival. *Aging*. 2020;12(12):12251–67.
79. Kostović I, Jovanov-Milošević N, Radoš M, Sedmak G, Benjak V, Kostović-Srzentić M *i sur*. Perinatal and early postnatal reorganization of the subplate and related cellular compartments in the human cerebral wall as revealed by histological and MRI approaches. *Brain Struct Funct*. 2014;219(1):231–53.
80. Kostović I, Kostović-Srzentić M, Benjak V, Jovanov-Milošević N, Radoš M. Developmental dynamics of radial vulnerability in the cerebral compartments in preterm infants and neonates. *Front Neurol*. 2014;5:1–13.
81. Milos RI, Jovanov-Milošević N, Mitter C, Bobić-Rasonja M, Pogledic I, Gruber GM *i sur*. Developmental dynamics of the periventricular parietal crossroads of growing cortical pathways in the fetal brain – In vivo fetal MRI with histological correlation. *Neuroimage*. 2020;210:116553.
82. Milošević NJ, Judaš M, Aronica E, Kostovic I. Neural ECM in laminar organization and connectivity development in healthy and diseased human brain. *Prog Brain Res*. 2014;214:159–78.
83. Sheikh A, Meng X, Liu J, Mikhailova A, Kao JPY, Mcquillen PS *i sur*. Neonatal Hypoxia-Ischemia Causes Functional Circuit Changes in Subplate Neurons. *Cereb Cortex*. 2019;29(2):765–76.

84. Rumajogee P, Bregman T, Miller SP, Yager JY, Fehlings MG. Rodent hypoxia-ischemia models for cerebral palsy research: A systematic review. *Front Neurol.* 2016;7(57):1–20.
85. Miyamoto O, Auer RN. Hypoxia, hyperoxia, ischemia, and brain necrosis. *Neurology.* 2000;54(2):362–379.
86. Galinsky R, Lear CA, Dean JM, Wassink G, Dhillon SK, Fraser M *i sur.* Complex interactions between hypoxia-ischemia and inflammation in preterm brain injury. *Dev Med Child Neurol.* 2018;60(2):126–33.
87. Vannucci SJ, Back SA. The Vannucci Model of Hypoxic-Ischemic Injury in the Neonatal Rodent: 40 years Later. *Dev Neurosci.* 2022;1–8.
88. Golan H, Huleihel M. The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. *Dev Sci.* 2006;9(4):338–49.
89. Workman AD, Charvet CJ, Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. Modeling Transformations of Neurodevelopmental Sequences across Mammalian Species. *J Neurosci.* 2013;33(17):7368–83.
90. Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol.* 2013;106–107:1–16.
91. Mallard C, Vexler ZS. Modeling Ischemia in the Immature Brain: How Translational Are Animal Models? *Stroke.* 2015;46(10):3006–11.
92. Hagberg H, Peebles D, Mallard C. Models of white matter injury: Comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002;8(1):30–8.
93. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol.* 1981;9(2):131–41.
94. Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J *i sur.* Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res.* 1999;55(2):158–63.

95. Nalivaeva NN, Turner AJ, Zhuravin IA. Role of Prenatal Hypoxia in Brain Development, Cognitive Functions, and Neurodegeneration. *Front Neurosci*. 2018;12(825):1–21.
96. Rumajogee P, Bregman T, Miller SP, Yager JY, Fehlings MG. Rodent Hypoxia–Ischemia Models for Cerebral Palsy Research: A Systematic Review. *Front Neurol*. 2016;7(57):1–20.
97. Roohey T, Raju TNK, Moustogiannis AN. Animal models for the study of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a critical analysis. *Early Hum Dev*. 1997;47(2):115–46.
98. Girard S, Kadhim H, Beaudet N, Sarret P, Sébire G. Developmental motor deficits induced by combined fetal exposure to lipopolysaccharide and early neonatal hypoxia/ischemia: A novel animal model for cerebral palsy in very premature infants. *Neuroscience*. 2009;158(2):673–82.
99. Yang T, Zhuang L, Terrando N, Wu X, Jonhson MR, Maze M *i sur*. A clinically relevant model of perinatal global ischemic brain damage in rats. *Brain Res*. 2011;1383:317–23.
100. Sheldon RA, Chuai J, Ferriero DM. A rat model for hypoxic-ischemic brain damage in very premature infants. *Biol Neonate*. 1996;69(5):327–41.
101. Zhang Q, Ding Y, Yao Y, Yu Y, Yang L, Cui H. Creating rat model for hypoxic brain damage in neonates by oxygen deprivation. *PLoS One*. 2013;8(12):e83589.
102. Quairiaux C, Sizonenko S V., Megevand P, Michel CM, Kiss JZ. Functional Deficit and Recovery of Developing Sensorimotor Networks following Neonatal Hypoxic-Ischemic Injury in the Rat. *Cereb Cortex*. 2010;20(9):2080–91.
103. Grafe MR. Developmental changes in the sensitivity of the neonatal rat brain to hypoxic/ischemic injury. *Brain Res*. 1994;653(1–2):161–6.
104. Huang Z, Liu J, Cheung P-Y, Chen C. Long-term cognitive impairment and myelination deficiency in a rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res*. 2009;1301:100–9.
105. Takada SH, dos Santos Haemmerle CA, Motta-Teixeira LC, Machado-Nils AV, Lee VY, Takase LF *i sur*. Neonatal anoxia in rats: Hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. *Neuroscience*. 2015;284:247–59.

106. Sukhanova IA, Sebentsova EA, Khukhareva DD, Manchenko DM, Glazova NY, Vishnyakova PA *i sur.* Gender-dependent changes in physical development, BDNF content and GSH redox system in a model of acute neonatal hypoxia in rats. *Behav Brain Res.* 2018;350:87–98.
107. Huang Y, Lai H, Xu H, Wu W, Lai X, Ho G *i sur.* Impact of Perinatal Systemic Hypoxic–Ischemic Injury on the Brain of Male Offspring Rats: An Improved Model of Neonatal Hypoxic–Ischemic Encephalopathy in Early Preterm Newborns. *PLoS One.* 2013;8(12):e82502.
108. Alexander M, Garbus H, Smith AL, Rosenkrantz TS, Fitch RH. Behavioral and histological outcomes following neonatal HI injury in a preterm (P3) and term (P7) rodent model. *Behav Brain Res.* 2014;259:85–96.
109. Kelly CE, Cheong JLY, Gabra Fam L, Leemans A, Seal ML, Doyle LW *i sur.* Moderate and late preterm infants exhibit widespread brain white matter microstructure alterations at term-equivalent age relative to term-born controls. *Brain Imaging Behav.* 2016;10(1):41–9.
110. Batalle D, Hughes EJ, Zhang H, Tournier JD, Tusor N, Aljabar P *i sur.* Early development of structural networks and the impact of prematurity on brain connectivity. *Neuroimage.* 2017;149:379–92.
111. Ball G, Seidlitz J, O’Muircheartaigh J, Dimitrova R, Fenchel D, Makropoulos A *i sur.* Cortical morphology at birth reflects spatiotemporal patterns of gene expression in the fetal human brain. *PLoS Biol.* 2020;18(11):e3000976.
112. Hrvatski sabor. Zakon o zaštiti životinja. *Narodne Novine.* 2017;NN 102/201:49.
113. Hrvatski sabor. Zakon o izmjenama i dopuni Zakona o zaštiti životinja. *Narodne Novine.* 2019;NN 32/2019(656):66.
114. Ministarstvo poljoprivrede. Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. *Narodne Novine.* 2013;NN 55/13(1129):60.
115. Ministarstvo poljoprivrede. Pravilnik o izmjenama Pravilnika o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. *Narodne Novine.* 2017;NN 39/2017(851):41.

116. Ministarstvo poljoprivrede. Pravilnik o izmjenama Pravilnika o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. Narodne Novine. 2019;NN 116/201(2320):4.
117. Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ *i sur.* Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. PLoS Biol. 2020;18(7):e3000411.
118. Bespalov A, Michel MC. Good Research Practice in Non-Clinical Pharmacology and Biomedicine. Cham: Springer International Publishing; 2020, str. 423.
119. Fox JG, Bennett BT. Chapter 1 - Laboratory Animal Medicine: Historical Perspectives. U: Fox JG, Anderson LC, Otto GM, Pritchett-Corning KR, Whary MT, ur. Laboratory Animal Medicine. 3. izd. San Diego: Elsevier; 2015, str. 1–21.
120. Bayne K, Anderson LC. Chapter 2 - Laws, Regulations, and Policies Affecting the Use of Laboratory Animals. U: Fox JG, Anderson LC, Otto GM, Pritchett-Corning KR, Whary MT, ur. Laboratory Animal Medicine. 3. izd. San Diego: Elsevier; 2015, str. 23–42.
121. Otto GM, Franklin CL, Clifford CB. Chapter 4 - Biology and Diseases of Rats. U: Fox JG, Anderson LC, Otto GM, Pritchett-Corning KR, Whary MT, ur. Laboratory Animal Medicine. 3. izd. San Diego: Elsevier; 2015, str. 151–207.
122. Bayne KAL, Beaver B V., Mench JA, Winnicker C. Chapter 38 - Laboratory Animal Behavior. U: Fox JG, Anderson LC, Otto GM, Pritchett-Corning KR, Whary MT, ur. Laboratory Animal Medicine. 3. izd. San Diego: Elsevier; 2015, str. 1617–1651.
123. Osborne N, Avey MT, Anestidou L, Ritskes-Hoitinga M, Griffin G. Improving animal research reporting standards: HARRP, the first step of a unified approach by ICLAS to improve animal research reporting standards worldwide. EMBO Rep. 2018;19(5):e46069.
124. Kirkwood J, Hubrecht R. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals. Hubrecht R, Kirkwood J, ur. 8 izd. Wiley; 2010, str. 837.
125. Harkness JE, Turner P V, Vandewoude S, Wheler CL. Harkness and Wagner's Biology and Medicine of Rabbits and Rodents. 5. izd. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2010, str. 472.

126. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; Institute for Laboratory Animal Research; Division on Earth and Life Studies. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8. izd. Washington, D.C.: National Academies Press; 2011, str. 246.
127. Suckow MA, Wilson RP, Hankenson FC, Foley PL. The Laboratory Rat. Suckow, Mark A.; Hankenson, F. Claire; Wilson, Ronald P.; Foley PL, ur. 3rd izd. Elsevier; 2020, str. 1162.
128. Kaur C, Sivakumar V, Ang LS, Sundaresan A. Hypoxic damage to the periventricular white matter in neonatal brain: role of vascular endothelial growth factor, nitric oxide and excitotoxicity. *J Neurochem.* 2006;98(4):1200–16.
129. Trnski S, Nikolić B, Ilic K, Drlje M, Bobic-Rasonja M, Darmopil S *i sur.* The Signature of Moderate Perinatal Hypoxia on Cortical Organization and Behavior: Altered PNN-Parvalbumin Interneuron Connectivity of the Cingulate Circuitries. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10(810980):1–17.
130. Phifer CB, Terry LM. Use of hypothermia for general anesthesia in preweanling rodents. *Physiol Behav.* 1986;38(6):887–90.
131. Office of Ethics and Compliance Institutional Animal Care and Use Program. Hypothermia / Cryoanesthesia in Neonatal Rodents. IACUC Standard Procedure. 2018;1–2.
132. Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *J Vis Exp.* 2012;(65):1–12.
133. Ramsey I. BSAVA Small Animal Formulary. Ramsey I, ur. 8. izd. British Small Animal veterinary Association; 2017, str. 492.
134. Ramachandra R, Subramanian T. Atlas of the Neonatal Rat Brain. Boca Raton: CRC Press; 2011, str. 188.
135. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 6. izd. San Diego: Academic Press; 2007, str. 456.
136. Bobić Rasonja M, Orešković D, Knezović V, Pogledić I, Pupačić D, Vukšić M *i sur.* Histological and MRI Study of the Development of the Human Indusium Griseum. *Cereb Cortex.* 2019;29(11):4709–24.

137. Ueno H, Suemitsu S, Murakami S, Kitamura N, Wani K, Matsumoto Y *i sur.* Hyaluronic acid is present on specific perineuronal nets in the mouse cerebral cortex. *Brain Res.* 2018;1698:139–50.
138. Ueno H, Takao K, Suemitsu S, Murakami S, Kitamura N, Wani K *i sur.* Age-dependent and region-specific alteration of parvalbumin neurons and perineuronal nets in the mouse cerebral cortex. *Neurochem Int.* 2018;112:59–70.
139. Boddaert J, Bielen K, 's Jongers B, Manocha E, Yperzeele L, Cras P *i sur.* CD8 signaling in microglia/macrophage M1 polarization in a rat model of cerebral ischemia. *PLoS One.* 2018;17;13(1):e0186937.
140. Ueno H, Suemitsu S, Okamoto M, Matsumoto Y, Ishihara T. Parvalbumin neurons and perineuronal nets in the mouse prefrontal cortex. *Neuroscience.* 2017;343:115–27.
141. Zemmar A, Weinmann O, Kellner Y, Yu X, Vicente R, Gullo M *i sur.* Neutralization of Nogo-A enhances synaptic plasticity in the rodent motor cortex and improves motor learning in vivo. *J Neurosci.* 2014;34(26):8685–98.
142. Yoon JS, Jo D, Lee H-S, Yoo S-W, Lee T-Y, Hwang WS *i sur.* Spatiotemporal Protein Atlas of Cell Death-Related Molecules in the Rat MCAO Stroke Model. *Exp Neurobiol.* 2018;27(4):287–98.
143. Kostović Srzentić M, Raguž M, Ozretić D. Specific cognitive deficits in preschool age correlated with qualitative and quantitative MRI parameters in prematurely born children. *Pediatr Neonatol.* 2020;61(2):160–7.
144. Zborowska-Sluis DT, Dossetor JB. Hyperlactatemia of hyperventilation. *J Appl Physiol.* 1967;22(4):746–55.
145. Kraut JA, Madias NE. Lactic Acidosis. *N Engl J Med.* 2014;371(24):2309–19.
146. Vannucci SJ, Simpson IA. Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. *Am J Physiol Metab.* 2003;285(5):E1127–34.
147. Roumes H, Dumont U, Sanchez S, Mazuel L, Blanc J, Raffard G *i sur.* Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2021;41(2):342–58.

148. Dumont U, Sanchez S, Olivier B, Chateil J-F, Deffieux D, Quideau S *i sur*. Maternal alcoholism and neonatal hypoxia-ischemia: Neuroprotection by stilbenoid polyphenols. *Brain Res.* 2020;1738:146798.
149. Dumont U, Sanchez S, Repond C, Beauvieux M-C, Chateil J-F, Pellerin L *i sur*. Neuroprotective Effect of Maternal Resveratrol Supplementation in a Rat Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Front Neurosci.* 2021;14(2):342–58.
150. Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91(22):10625–9.
151. Pellerin L, Magistretti PJ. Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(7):1152–66.
152. Hristova M, Cuthill D, Zbarsky V, Acosta-Saltos A, Wallace A, Blight K *i sur*. Activation and deactivation of periventricular white matter phagocytes during postnatal mouse development. *Glia.* 2010;58(1):11–28.
153. Fisch U, Brégère C, Geier F, Chicha L, Guzman R. Neonatal hypoxia-ischemia in rat elicits a region-specific neurotrophic response in SVZ microglia. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):26–44.
154. You Y, Kaur C. Expression of induced nitric oxide synthase in amoeboid microglia in postnatal rats following an exposure to hypoxia. *Neurosci Lett.* 2000;279(2):101–4.
155. Meng SZ, Arai Y, Deguchi K, Takashima S. Early detection of axonal and neuronal lesions in prenatal-onset periventricular leukomalacia. *Brain Dev.* 1997;19(7):480–4.
156. Farkas E, Donka G, de Vos RAI, Mihály A, Bari F, Luiten PGM. Experimental cerebral hypoperfusion induces white matter injury and microglial activation in the rat brain. *Acta Neuropathol.* 2004;108(1):57–64.
157. Svedin P, Kjellmer I, Welin A-K, Blad S, Mallard C. Maturation Effects of Lipopolysaccharide on White-Matter Injury in Fetal Sheep. *J Child Neurol.* 2005;20(12):960–4.



158. Leviton A, Gilles FH. Acquired perinatal leukoencephalopathy. *Ann Neurol.* 1984;16(1):1–8.
159. Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K. Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J Neurosci.* 2014;34(6):2231–43.
160. Van't Spijker HM, Rowlands D, Rossier J, Haenzi B, Fawcett JW, Kwok JCF. Neuronal Pentraxin 2 Binds PNNs and Enhances PNN Formation. *Neural Plast.* 2019;2019:1–13.
161. Kwok JCF, Yang S, Fawcett JW. Chapter 8 - Neural ECM in regeneration and rehabilitation. U: Dityatev A, Wehrle-Haller B, Pitkänen A, ur. *Brain Extracellular Matrix in Health and Disease.* Elsevier; 2014, str. 179–92.
162. Duncan JA, Foster R, Kwok JCF. The potential of memory enhancement through modulation of perineuronal nets. *Br J Pharmacol.* 2019;176(18):3611–21.
163. Carulli D, Verhaagen J. An Extracellular Perspective on CNS Maturation: Perineuronal Nets and the Control of Plasticity. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2434–60.
164. Hobohm C, Günther A, Grosche J, Rossner S, Schneider D, Brückner G. Decomposition and long-lasting downregulation of extracellular matrix in perineuronal nets induced by focal cerebral ischemia in rats. *J Neurosci Res.* 2005;80(4):539–48.
165. Bonneh-Barkay D, Wiley CA. Brain Extracellular Matrix in Neurodegeneration. *Brain Pathol.* 2009;19(4):573–85.
166. Wen TH, Binder DK, Ethell IM, Razak KA. The Perineuronal ‘Safety’ Net? Perineuronal Net Abnormalities in Neurological Disorders. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:270–87.
167. Ueno H, Suemitsu S, Murakami S, Kitamura N, Wani K, Okamoto M *in vivo*. Region-specific impairments in parvalbumin interneurons in social isolation-reared mice. *Neuroscience.* 2017;359:196–208.
168. Harkness JH, Bushana PN, Todd RP, Clegern WC, Sorg BA, Wisor JP. Sleep disruption elevates oxidative stress in parvalbumin-positive cells of the rat cerebral cortex. *Sleep.* 2019;42(1):1–31.

169. Banerjee SB, Gutzeit VA, Baman J, Aoued HS, Doshi NK, Liu RC *i sur.* Perineuronal Nets in the Adult Sensory Cortex Are Necessary for Fear Learning. *Neuron.* 2017;95(1):169-179.
170. Shi W, Wei X, Wang X, Du S, Liu W, Song J *i sur.* Perineuronal nets protect long-term memory by limiting activity-dependent inhibition from parvalbumin interneurons. *Proc Natl Acad Sci.* 2019;116(52):27063–73.
171. Carbo-Gas M, Moreno-Rius J, Guarque-Chabrera J, Vazquez-Sanroman D, Gil-Miravet I, Carulli D *i sur.* Cerebellar perineuronal nets in cocaine-induced pavlovian memory: Site matters. *Neuropharmacology.* 2017;125:166–80.
172. Slaker ML, Jorgensen ET, Hegarty DM, Liu X, Kong Y, Zhang F *i sur.* Cocaine Exposure Modulates Perineuronal Nets and Synaptic Excitability of Fast-Spiking Interneurons in the Medial Prefrontal Cortex. *eneuro.* 2018;5(5):1–17.
173. Morawski M, Brückner MK, Riederer P, Brückner G, Arendt T. Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. *Exp Neurol.* 2004;188(2):309–15.
174. Cabungcal J-H, Steullet P, Morishita H, Kraftsik R, Cuenod M, Hensch TK *i sur.* Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(22):9130–5.
175. Suttkus A, Rohn S, Weigel S, Glöckner P, Arendt T, Morawski M. Aggrecan, link protein and tenascin-R are essential components of the perineuronal net to protect neurons against iron-induced oxidative stress. *Cell Death Dis.* 2014;5(3):e1119–e1119.
176. Happel MFK, Niekisch H, Castiblanco Rivera LL, Ohl FW, Deliano M, Frischknecht R. Enhanced cognitive flexibility in reversal learning induced by removal of the extracellular matrix in auditory cortex. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(7):2800–5.
177. Carulli D, Broersen R, de Winter F, Muir EM, Mešković M, de Waal M *i sur.* Cerebellar plasticity and associative memories are controlled by perineuronal nets. *Proc Natl Acad Sci.* 2020;117(12):6855–65.

178. Hirono M, Watanabe S, Karube F, Fujiyama F, Kawahara S, Nagao S *i sur*. Perineuronal Nets in the Deep Cerebellar Nuclei Regulate GABAergic Transmission and Delay Eyeblink Conditioning. *J Neurosci*. 2018;38(27):6130–44.
179. Bertocchi I, Mele P, Ferrero G, Oberto A, Carulli D, Eva C. NPY-Y1 receptor signaling controls spatial learning and perineuronal net expression. *Neuropharmacology*. 2021;184(108425):1–25.
180. Cooper BG, Mizumori SJY. Temporary Inactivation of the Retrosplenial Cortex Causes a Transient Reorganization of Spatial Coding in the Hippocampus. *J Neurosci*. 2001;21(11):3986–4001.
181. Cooper BG, Manka TF, Mizumori SJY. Finding your way in the dark: The retrosplenial cortex contributes to spatial memory and navigation without visual cues. *Behav Neurosci*. 2001;115(5):1012–28.
182. Brückner G, Grosche J, Hartlage-Rübsamen M, Schmidt S, Schachner M. Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation. *J Chem Neuroanat*. 2003;26(1):37–50.
183. Carulli D, Rhodes KE, Fawcett JW. Upregulation of aggrecan, link protein 1, and hyaluronan synthases during formation of perineuronal nets in the rat cerebellum. *J Comp Neurol*. 2007;501(1):83–94.
184. Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT. Extracellular matrix of the central nervous system: From neglect to challenge. *Histochem Cell Biol*. 2008;130(4):635–53.
185. Hering TM, Beller JA, Calulot CM, Centers A, Snow DM. Proteoglycans of reactive rat cortical astrocyte cultures: Abundance of N-unsubstituted glucosamine-enriched heparan sulfate. *Matrix Biol*. 2015;41:8–18.
186. Carulli D, Rhodes KE, Brown DJ, Bonnert TP, Pollack SJ, Oliver K *i sur*. Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J Comp Neurol*. 2006;494(4):559–77.

187. Kwok JCF, Carulli D, Fawcett JW. In vitro modeling of perineuronal nets: Hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *J Neurochem.* 2010;114(5):1447–59.
188. Giamanco KA, Morawski M, Matthews RT. Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. *Neuroscience.* 2010;170(4):1314–27.
189. Yamada J, Jinno S. Molecular heterogeneity of aggrecan-based perineuronal nets around five subclasses of parvalbumin-expressing neurons in the mouse hippocampus. *J Comp Neurol.* 2017;525(5):1234–49.
190. Haunsoø A, Ibrahim M, Bartsch U, Letiembre M, Celio MR, Menoud PA. Morphology of perineuronal nets in tenascin-R and parvalbumin single and double knockout mice. *Brain Res.* 2000;864(1):142–5.
191. Riga D, Kramvis I, Koskinen MK, Van Bokhoven P, Van Der Harst JE, Heistek TS *i sur.* Hippocampal extracellular matrix alterations contribute to cognitive impairment associated with a chronic depressive-like state in rats. *Sci Transl Med.* 2017;9(421):eaai8753.
192. Romberg C, Yang S, Melani R, Andrews MR, Horner AE, Spillantini MG *i sur.* Depletion of perineuronal nets enhances recognition memory and long-term depression in the perirhinal cortex. *J Neurosci.* 2013;33(16):7057–65.
193. Simonetti T, Lee H, Bourke M, Leamey CA, Sawatari A. Enrichment from birth accelerates the functional and cellular development of a motor control area in the mouse. *PLoS One.* 2009;4(8):e6780.
194. Balmer TS, Carels VM, Frisch JL, Nick TA. Modulation of perineuronal nets and parvalbumin with developmental song learning. *J Neurosci.* 2009;29(41):12878–85.
195. Cichon S, Mühleisen TW, Degenhardt FA, Mattheisen M, Miró X, Strohmaier J *i sur.* Genome-wide Association Study Identifies Genetic Variation in Neurocan as a Susceptibility Factor for Bipolar Disorder. *Am J Hum Genet.* 2011;88(3):372–81.
196. Miró X, Meier S, Dreisow ML, Frank J, Strohmaier J, Breuer R *i sur.* Studies in humans and mice implicate neurocan in the etiology of mania. *Am J Psychiatry.* 2012;169(9):982–90.

197. Howell MD, Gottschall PE. Altered synaptic marker abundance in the hippocampal stratum oriens of Ts65Dn mice is associated with exuberant expression of versican. *ASN Neuro*. 2012;4(1):11–22.
198. Coleman LG, Liu W, Oguz I, Styner M, Crews FT. Adolescent binge ethanol treatment alters adult brain regional volumes, cortical extracellular matrix protein and behavioral flexibility. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;116:142–51.
199. Schüppel K, Brauer K, Härtig W, Grosche J, Earley B, Leonard BE *i sur*. Perineuronal nets of extracellular matrix around hippocampal interneurons resist destruction by activated microglia in trimethyltin-treated rats. *Brain Res*. 2002;958(2):448–53.
200. Lu A, Tang Y, Ran R, Clark JF, Aronow BJ, Sharp FR. Genomics of the Periinfarction Cortex after Focal Cerebral Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23(7):786–810.
201. Inatani M, Tanihara H, Oohira A, Honjo M, Kido N, Honda Y. Upregulated Expression of Neurocan, a Nervous Tissue Specific Proteoglycan, in Transient Retinal Ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(9):2748–54.
202. Asher RA, Morgenstern DA, Moon LD, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans: inhibitory components of the glial scar. *Prog Brain Res*. 2001;132:611–9.
203. Rhodes KE, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J Anat*. 2004;204(1):33–48.
204. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(2):146–56.
205. Dzyubenko E, Gottschling C, Faissner A. Neuron-Glia Interactions in Neural Plasticity: Contributions of Neural Extracellular Matrix and Perineuronal Nets. *Neural Plast*. 2016;2016(5214961):1–14.
206. Dzyubenko E, Manrique-Castano D, Kleinschnitz C, Faissner A, Hermann DM. Topological remodeling of cortical perineuronal nets in focal cerebral ischemia and mild hypoperfusion. *Matrix Biol*. 2018;74:121–32.

207. Decker M., Hue G., Caudle W., Miller G., Keating G., Rye D. Episodic neonatal hypoxia evokes executive dysfunction and regionally specific alterations in markers of dopamine signaling. *Neuroscience*. 2003;117(2):417–25.
208. Decker MJ, Jones KA, Solomon IG, Keating GL, Rye DB. Reduced extracellular dopamine and increased responsiveness to novelty: neurochemical and behavioral sequelae of intermittent hypoxia. *Sleep*. 2005;28(2):169–76.
209. Mikati MA, Zeinieh MP, Kurdi RM, Harb SA, El Hokayem JA, Daderian RH *i sur*. Long-term effects of acute and of chronic hypoxia on behavior and on hippocampal histology in the developing brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 2005;157(1):98–102.
210. Dell’Anna ME, Calzolari S, Molinari M, Iuvone L, Calimici R. Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. *Behav Brain Res*. 1991;45(2):125–34.
211. Shimomura C, Ohta H. Behavioral abnormalities and seizure susceptibility in rat after neonatal anoxia. *Brain Dev*. 1988;10(3):160–3.
212. Speiser Z, Uziel J, Defrin-Assa R, Gitter S, Urca G. Different behavioral deficits are induced by anoxia/hypoxia in neonatal and senescent rats: blockade by MK-801. *Behav Brain Res*. 1991;42(2):181–6.
213. Iuvone L, Geloso MC, Dell’Anna E. Changes in Open Field Behavior, Spatial Memory, and Hippocampal Parvalbumin Immunoreactivity Following Enrichment in Rats Exposed to Neonatal Anoxia. *Exp Neurol*. 1996;139(1):25–33.
214. Buwalda B, Nyakas C, Vosselman HJ, Luiten PGM. Effects of early postnatal anoxia on adult learning and emotion in rats. *Behav Brain Res*. 1995;67(1):85–90.
215. Delcour M, Russier M, Amin M, Baud O, Paban V, Barbe MF *i sur*. Impact of prenatal ischemia on behavior, cognitive abilities and neuroanatomy in adult rats with white matter damage. *Behav Brain Res*. 2012;232(1):233–44.

216. Delcour M, Olivier P, Chambon C, Pansiot J, Russier M, Liberge M *i sur*. Neuroanatomical, sensorimotor and cognitive deficits in adult rats with white matter injury following prenatal ischemia. *Brain Pathol.* 2012;22(1):1–16.
217. Blanco E, Galeano P, Holubiec MI, Romero JI, Logica T, Rivera P *i sur*. Perinatal asphyxia results in altered expression of the hippocampal acylethanolamide/endocannabinoid signaling system associated to memory impairments in postweaned rats. *Front Neuroanat.* 2015;9:1–16.
218. McClure MM, Threlkeld SW, Rosen GD, Holly Fitch R. Rapid auditory processing and learning deficits in rats with P1 versus P7 neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behav Brain Res.* 2006;172(1):114–21.
219. Raveendran AT, Skaria PC. Learning and Cognitive Deficits in Hypoxic Neonatal Rats Intensified by BAX Mediated Apoptosis: Protective Role of Glucose, Oxygen, and Epinephrine. *Int J Neurosci.* 2012;123(2):80–8.
220. Galeano P, Blanco E, Logica Tornatore TMA, Romero JI, Holubiec MI, Rodríguez de Fonseca F *i sur*. Life-long environmental enrichment counteracts spatial learning, reference and working memory deficits in middle-aged rats subjected to perinatal asphyxia. *Front Behav Neurosci.* 2014;8:406.

## 11. ŽIVOTOPIS

Sara Trnski rođena je 16. ožujka 1992. u Koprivnici. Diplomirala je na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2017. godine. Iste godine zaposlila se na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a 2018. godine temeljem projekta HRZZ-a „Razvoj karijera mladih istraživača“ i u okviru projekta Znanstvenog centra izvrsnosti (ZCI-Neuro). Od 2020. suradnica je na HRZZ projektu BrainECM.

Znanstveno se usavršavala u trajanju od šest tjedana na Medicinskom fakultetu Semmelweis Sveučilišta u Budimpešti, a uspješno je završila 3 tečaja: Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama; Tečaj iz eksperimentalnog dizajna; Tečaj iz analize slika biološkog podrijetla.

Do sada je objavila četiri znanstvena članka u kvartili Q1 i dvadeset četiri kongresna priopćenja. Koautorica je jednog poglavlja u udžbeniku „Medicinska etika“ i jednog stručnog rada. Dobitnica je nagrade za najbolju poster prezentaciju na 3. znanstveno-stručnom simpoziju Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama i 2. zajedničkom skupu CroLASA-e i SLAS-a s međunarodnim sudjelovanjem „Pokusne životinje u znanstvenim istraživanjima“.

Aktivno je sudjelovala u Tjednu mozga održavajući predavanja u Koprivničko-križevačkoj županiji. Također, mentorirala je učenicu Paulu Šego za međunarodno Brain Bee natjecanje te studenticu Dariju Putar pri izradi diplomskog rada.





# The Signature of Moderate Perinatal Hypoxia on Cortical Organization and Behavior: Altered PNN-Parvalbumin Interneuron Connectivity of the Cingulate Circuitries

Sara Trnski<sup>1†</sup>, Barbara Nikolić<sup>2†</sup>, Katarina Ilic<sup>1,3</sup>, Matea Drlje<sup>1</sup>, Mihaela Bobic-Rasonja<sup>1,4</sup>, Sanja Darmopil<sup>1,5</sup>, Zdravko Petanjek<sup>1,5</sup>, Dubravka Hranilovic<sup>2</sup> and Natasa Jovanov-Milosevic<sup>1,4\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Roel Quintens,  
Belgian Nuclear Research Centre,  
Belgium

### Reviewed by:

Gavin John Clowry,  
Newcastle University, United Kingdom  
Pavle R. Andjus,  
University of Belgrade, Serbia  
Zoltan Molnar,  
University of Oxford, United Kingdom

### \*Correspondence:

Natasa Jovanov-Milosevic  
njovanov@hiim.hr

<sup>†</sup>These authors share first authorship

### Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular and Cellular Pathology,  
a section of the journal  
Frontiers in Cell and Developmental  
Biology

**Received:** 08 November 2021

**Accepted:** 11 January 2022

**Published:** 28 February 2022

### Citation:

Trnski S, Nikolić B, Ilic K, Drlje M,  
Bobic-Rasonja M, Darmopil S,  
Petanjek Z, Hranilovic D and  
Jovanov-Milosevic N (2022) The  
Signature of Moderate Perinatal  
Hypoxia on Cortical Organization and  
Behavior: Altered PNN-Parvalbumin  
Interneuron Connectivity of the  
Cingulate Circuitries.  
*Front. Cell Dev. Biol.* 10:810980.  
doi: 10.3389/fcell.2022.810980

<sup>1</sup>Croatian Institute for Brain Research, School of Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia, <sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb, Zagreb, Croatia, <sup>3</sup>Department of Neuroimaging, BRAIN Centre, Institute of Psychiatry, Psychology, and Neuroscience, King's College London, London, United Kingdom, <sup>4</sup>Department of Biology, School of Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia, <sup>5</sup>Department of Anatomy and Clinical Anatomy, School of Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

This study was designed in a rat model to determine the hallmarks of possible permanent behavioral and structural brain alterations after a single moderate hypoxic insult. Eighty-two Wistar Han (RccHan: WIST) rats were randomly subjected to hypoxia (pO<sub>2</sub> 73 mmHg/2 h) or normoxia at the first postnatal day. The substantially increased blood lactate, a significantly decreased cytochrome-C-oxygenase expression in the brain, and depleted subventricular zone suggested a high vulnerability of subset of cell populations to oxidative stress and consequent tissue response even after a single, moderate, hypoxic event. The results of behavioral tests (open-field, hole-board, social-choice, and T-maze) applied at the 30–45th and 70–85th postnatal days revealed significant hyperactivity and a slower pace of learning in rats subjected to perinatal hypoxia. At 3.5 months after hypoxic insult, the histochemical examination demonstrated a significantly increased number of specific extracellular matrix—perineuronal nets and increased parvalbumin expression in a subpopulation of interneurons in the medial and retrosplenial cingulate cortex of these animals. Conclusively, moderate perinatal hypoxia in rats causes a long-lasting reorganization of the connectivity in the cingulate cortex and consequent alterations of related behavioral and cognitive abilities. This non-invasive hypoxia model in the rat successfully and complementarily models the moderate perinatal hypoxic injury in fetuses and prematurely born human babies and may enhance future research into new diagnostic and therapeutic strategies for perinatal medicine.

**Keywords:** plasticity, oxidative stress, cortical development, learning disabilities, hyperactivity behaviors

## INTRODUCTION

Perinatal cerebral hypoxia-ischemia and preterm birth are the most common causes of neurological disorders or impaired brain function of developmental origin (Volpe, 2012; Vohr, 2014; Laptook, 2016; Vanes et al., 2021). Although current advances in medicine provide good perinatal care, 30% of premature babies who survive still suffer from neurodevelopmental motor, cognitive, or behavioral deficits in childhood

or later in life (Johnson, 2011; Franz et al., 2018). Despite the multifactorial and combinatorial etiology (genetic, trophic, infectious, inflammatory, ante- or postnatally), the most frequently found periventricular white matter injury, commonly results from hypoxic-ischemic reperfusion failure (Liu et al., 2013; Clowry et al., 2014; Millar et al., 2017). The highest vulnerability of the human brain to hypoxic injuries is between 22- and 34 weeks of gestation, at the stage of intensive cell migration, glial cell proliferation, axon guidance, synaptogenesis, and dendrite and connectivity elements differentiation. In addition to periventricular regions, the axonal crossroads and subplate zone with an abundance of extracellular matrix and transient circuitries are at particular risk (Kostović et al., 2014a; Kostović et al., 2014b; Milošević et al., 2014; Milos et al., 2020).

A “gold standard” of animal models in performing hypoxic-ischemic brain injury is the Rice-Vannucci model and its numerous modifications (Rice et al., 1981; Vannucci et al., 1999; Millar et al., 2017). In rodents, the time frame from postnatal day (P) 1 to P3 is approximately equivalent to the period of 22–32 weeks of gestation (wg) for human brain development, based on morphogenetic processes, such as proliferation and migration, while P7–10 approximately correspond to 32–40 wg according to vasculogenesis and time of six-layered cortex formation. P40 approximately corresponds to the maturation of interneurons and approximately P60, corresponds to early adulthood cortex (Semple et al., 2013).

Depending on the developmental stage of the animal and the intensity of the provoked hypoxia, the extent of the neuronal dysfunction in these models ranges from severe, with significant pathology that intercepts most of the developmental processes suddenly (including ischemia infarction, hemorrhage necrosis, inflammation with cytokine secretion, massive activation of microglia and astroglia, scarification), to less severe lesions such as disorganized barrels field in the somatosensory cortex, focal neuronal loss, and edema (Rice et al., 1981; Vannucci et al., 1999; Quairiaux et al., 2010; Zhang et al., 2013). Due to the severity of the injury, an acutely increased expression of cleaved caspase-3 protein and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (Hif-1 $\alpha$ ) in addition to deficits in spatial reference memory, disturbed motor, and auditory abilities, have been reported (Huang et al., 2013; Alexander et al., 2014; Takada et al., 2015; Sukhanova et al., 2018).

However, although many studies have used these animal models, studies of moderate hypoxic injury and its long-term effects, especially at the brain structural (histological) and functional (behavioral) level, are missing or scant (Clowry et al., 2014; Millar et al., 2017). The moderate hypoxic events in human fetuses during the midgestation period, frequently remain unnoticed. However, they might induce consequent processes leading to medical issues in vulnerable and predisposed individuals, ending with pregnancy termination or the birth of extremely premature born babies. In less susceptible subjects, they might lead to long-term brain structural or behavioral alterations. Most of the postmortem human brain tissue received from pathology departments and used in translational studies is staged 18–30 weeks of gestation. Thus, for translational studies in perinatal medicine, developing a corresponding P1 model, complementary to other animal later period models, could be critical.

Some moderate hypoxia events in fetuses and prematurely born babies (unnoticed acutely) are recognized later as a cause of

cognitive or behavioral deficits during early school days or adolescence. These deficits are related to a developmental hypoxic incident that causes moderate to subtle white matter or cortical microstructure pathology (Johnson and Marlow, 2011; Kelly et al., 2016; Batalle et al., 2017; Ball et al., 2020).

The interneurons and gamma-aminobutyric acid (GABA) signaling are recognized as a common substrate of the perinatal injuries that underlie many neurodevelopmental disorders (Deidda et al., 2014). The interneurons make up 10–30% of cortical neurons (Defelipe et al., 2013), more represented in humans than in rodents. Approximately 40% of all GABA-ergic neurons express parvalbumin protein, which are the main interneuron population in rodents (Rudy et al., 2011). Parvalbumin neurons are mainly fast-spiking GABA-ergic neurons that have a fundamental role in the moderation of excitation and inhibition within cortical circuits (Ferguson and Gao 2018).

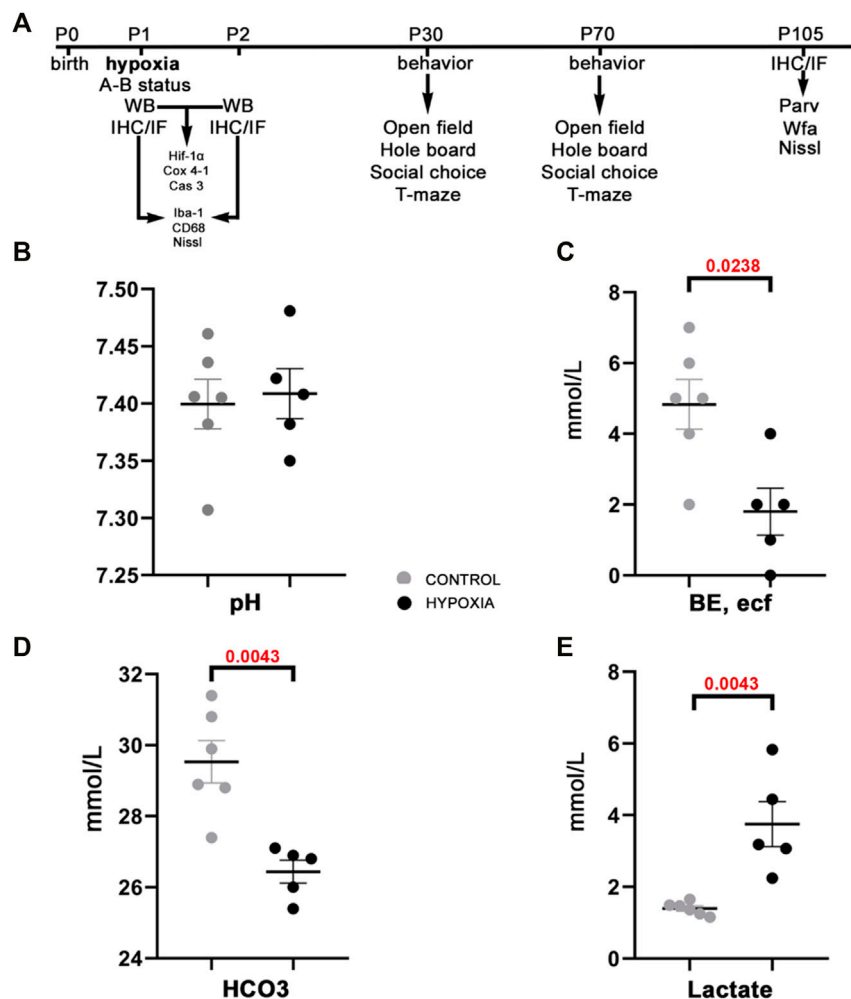
The parvalbumine-positive interneurons (PV) are found to be affected in many neurological and psychiatric disorders of developmental origin in humans and in the animals that model these disorders (Gandal et al., 2012; Filice et al., 2016; Hashemi et al., 2018; Vogt et al., 2018). The PV frequently have a specialized, condensed, extracellular matrix coating called perineuronal nets (PNN), which is known to have a modulating role in GABA signaling and neural plasticity after injury (Bitanhirwe and Woo, 2014; Fawcett et al., 2019). The experience-dependent synaptic plasticity in adulthood also relies particularly on PNN around fast-spiking PV (Wang and Fawcett, 2012; Sorg et al., 2016). Several preclinical studies have analyzed PNN after acute hypoxic brain injury (Härtig et al., 2017; Stolp et al., 2019). However, the long-term effects of perinatal hypoxia incidents, particularly the mild to moderate effects, on PNN—interneurons development and consequent brain function, have not been investigated. However, disclosing molecular and cellular cause-consequence sequela, the time points of highest vulnerability, and their relation to neurological and cognitive outcome, could significantly improve our understanding of perinatal hypoxia and enhance the search for potential therapeutic targets.

We hypothesized that the development of the PNN—interneuron complex is highly vulnerable, even to a single, moderate hypoxic event. We aim to investigate the effect of moderate hypoxia on early neonatal development in a rat model (P1, which corresponds to the mid-fetal and early premature period in humans), in the acute phase at the molecular and cellular levels and in the chronic time frame, examining the subsequent structural reorganization level. Finally, we correlated these changes with the functional consequences, investigating the behavioral outcome in juvenile and adult animals.

## RESULTS

### Acute Molecular, Cellular, and Structural Brain Changes After Moderate Perinatal Hypoxia

Immediately after hypoxic conditions were terminated, we measured the acute metabolic response by assessing the acid-base status in treated and control animals. The assessment of the acid-base status has

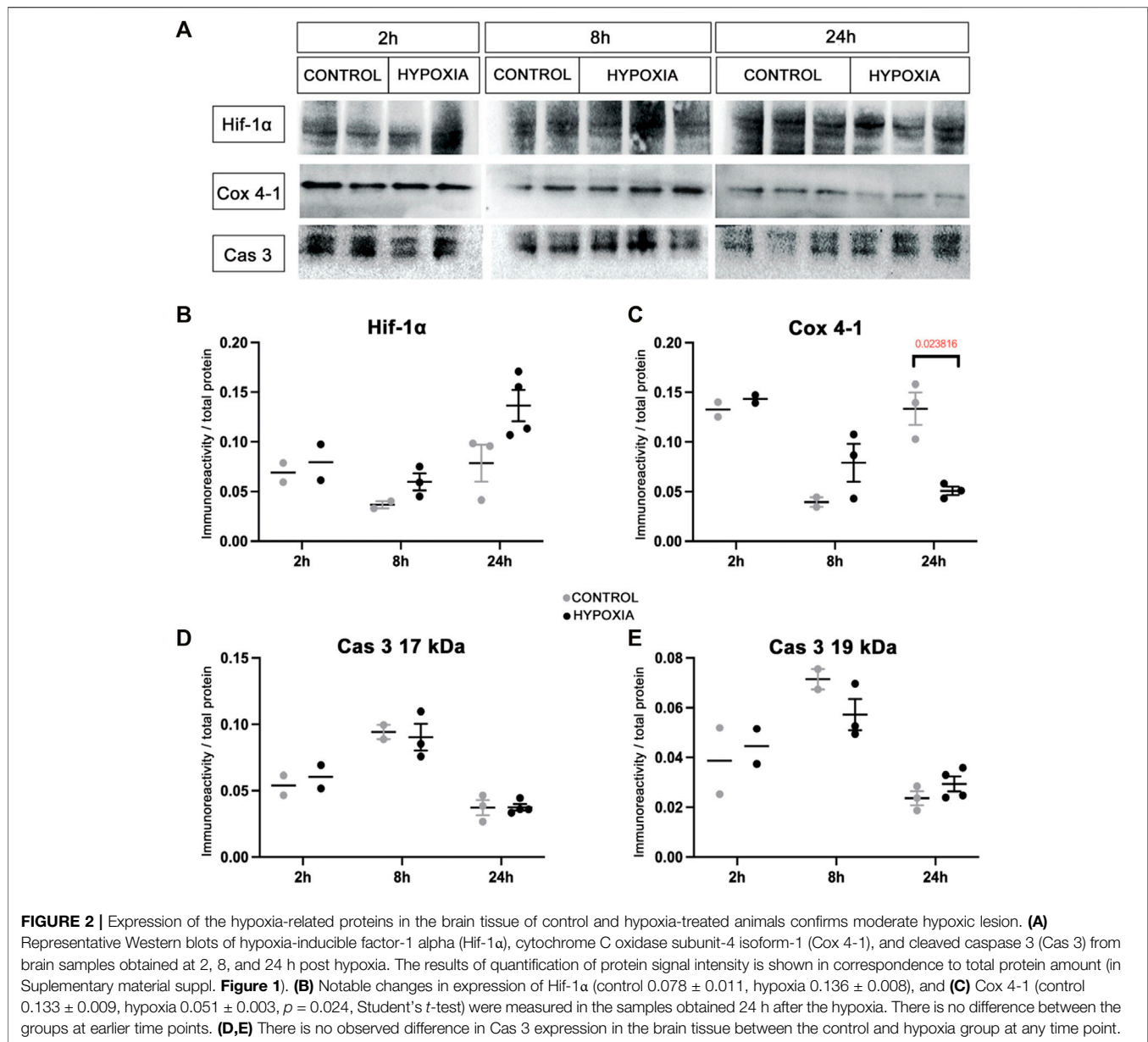


**FIGURE 1 |** The study design and acid-base status of the animals indicate sufficient compensatory buffers capacity, ensuring acid-base homeostasis at this design of moderate perinatal hypoxia in rat. **(A)** A presentation of the study design by timeline with the time points chosen for data acquisition by various tests, staining's of brain tissue sections, and subsequent qualitative and quantitative analysis of the behavior and brain structures. Treated and control animal distribution per each experiment is presented in **Supplementary Table S1**. The treated rats were subjected to hypoxia (during 2 h) at P1. Immediately after, some were sacrificed to measure different parameters of A-B status. Other animals were sacrificed later at 8 h, and 24 h after hypoxia for brain samples, on which WB, IF, IHC were employed with different antibodies. The antibodies used in the study are listed in **Table 1**. The remainder of the animals were tested at two different age points: starting at P30 and P70 during five subsequent days. The animals were tested with four behavioral tests (open field, hole board, social choice, T-maze). These animals were sacrificed at P105 to isolate the brain tissue for differential staining's and further data acquisition. **(B–E)** The values of different blood parameters showing acid-base status measured immediately after hypoxia. **(B)** The pH (hydrogen potential) values speak in favor of sufficient compensatory capacity that ameliorates electrolyte imbalance in the rat neonates. **(C)** BE, ecf (base excess in the extracellular fluid) show significantly lower values in the hypoxic animals due to depletion of base buffers for compensation of the metabolic acidosis. **(D,E)** The HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (bicarbonate) and lactate concentrations in the blood show statistically significant differences between hypoxia-treated and control animals, proving shift from aerobic to anaerobic metabolic condition in the tissue as a consequence of hypoxia. All results are shown as mean ± standard error of the mean (SEM). P—postnatal day; A-B—acid-base status; WB—Western blot; IHC/IF—immunohistochemistry and/or immunofluorescence; Hif-1 $\alpha$ —hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ; Cox 4-1—cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1; Cas 3—caspase 3; Iba-1—ionized-calcium-binding-adaptor-molecule-1; CD68—class D scavenger receptor 68; Nissl (modification of cresyl-violet) staining; Parv—parvalbumin; Wfa—Wisteria floribunda agglutinin.

confirmed the metabolic shift, a statistically significantly lower BE, ecf ( $p = 0.0238$ ; **Figure 1C**), lower total HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ( $p = 0.0043$ ; **Figure 1D**), and higher lactate concentrations ( $p = 0.0043$ ; **Figure 1E**) in the blood of hypoxic animals as a consequence of acute generalized hypoxic stress. Even though pups showed restlessness, shortness of breath, convulsive twitching of the whole body, and general cyanosis during the hypoxia (video available upon request), the pH blood values were maintained

within the physiological range (**Figure 1B**), and shortly after the hypoxia, pups looked seemingly healthy and behaved age-appropriately. These findings suggest a sufficient extracellular buffers capacity and rapid achievement of acid-base homeostasis after the hypoxic incident in the pups.

At the brain tissue molecular level, alterations in the expression of hypoxia-inducible factor-1-alpha (Hif-1 $\alpha$ ) and the expression of the cytochrome-c-oxidase subunit-4 isoform-

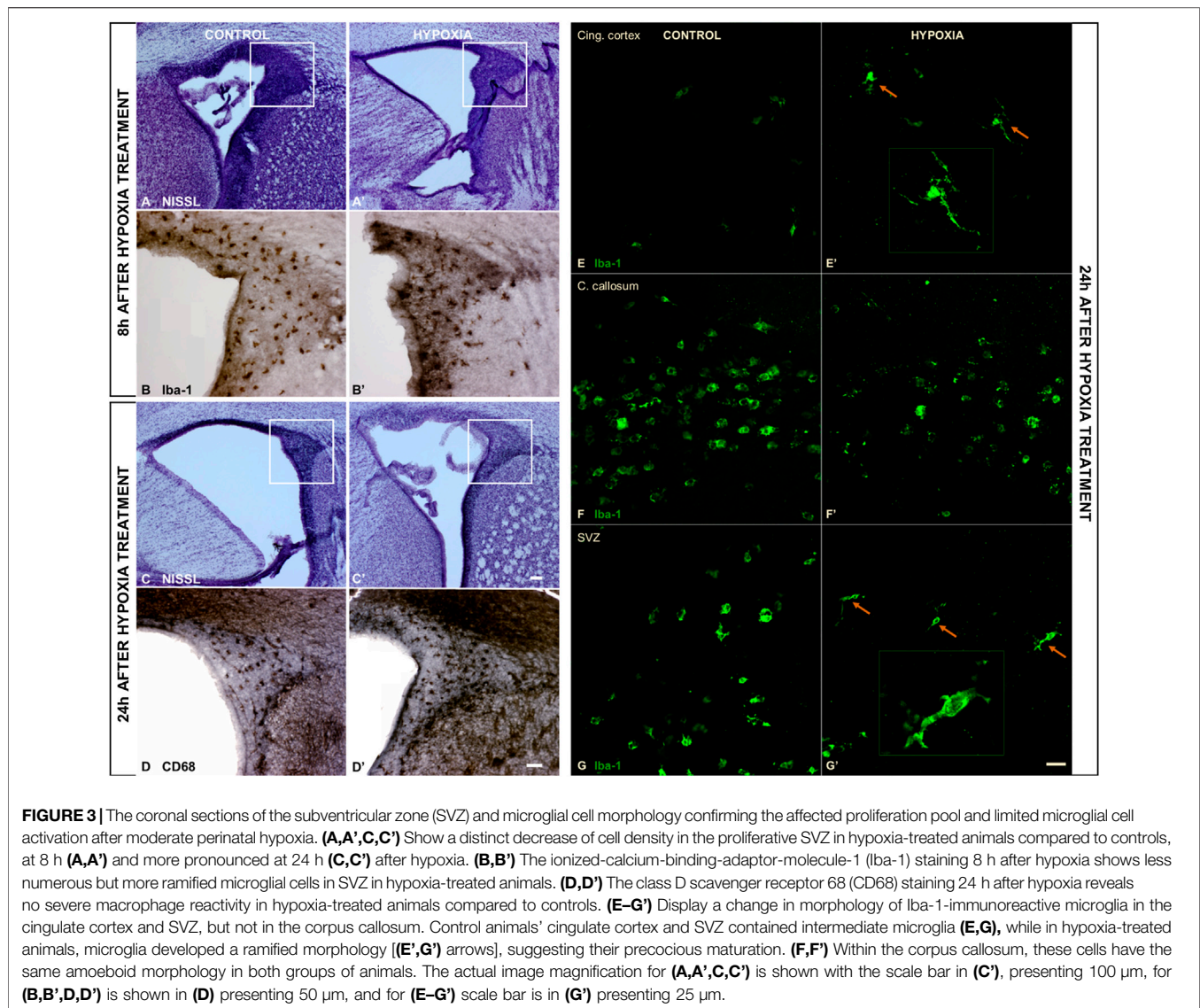


1 (Cox 4-1) were observed (**Figure 2A**). The increase in the expression of Hif-1 $\alpha$  protein was most notable at 24 h post hypoxia (**Figure 2B**). In addition, a gradual decrease of the Cox 4-1 protein expression was observed, becoming statistically significant at 24 h after hypoxia ( $p = 0.0238$ ; **Figure 2C**). No difference in the expression of the activated caspase-3 protein (Cas 3) was detected between the two groups (**Figures 2D,E**).

An examination of the macromorphology of brains and sections stained by cresyl-violet (Nissl modification) showed an absence of gross pathological or anatomical changes. However, a lower cell density was observed in the subventricular zone (SVZ) 8 h post hypoxia (**Figure 3A'**), which was more pronounced 24 h post hypoxia (**Figure 3C'**) when compared with the SVZ of control

animals (**Figures 3A,C**). The SVZ of hypoxia-treated animals also showed fewer ionized-calcium-binding-adaptor-molecule-1 immunohistochemically reactive cells (Iba-1), with increased content of Iba-1 protein in the immediate extracellular cell vicinity (**Figure 3B'**), compared to controls (**Figure 3B**). Despite an overall lower cell density in the SVZ at 24 h after hypoxia, we observed more class D scavenger receptor 68-expressing cells (CD68) in this zone, particularly its dorsal-lateral portion (**Figure 3D'** compared to D). The Iba-1 positive cells showed an advanced differentiation at 24 h after subsection to hypoxia, acquiring the morphology of mature microglia in the cingulate cortex (**Figures 3E,E'**) and in the SVZ (**Figures 3G,G'**). There was no difference in the morphology of amoeboid Iba-1-positive cells in the corpus callosum between the two groups (**Figures 3F,F'**). Amoeboid





microglial cells in both groups are probably engaged primarily in phagocytosis of the exuberant developmental axons in the corpus callosum. Altogether, examination of the histological sections revealed acute injury of proliferation processes in the SVZ and consequent mild microglial cell activation in this model of moderate perinatal hypoxia.

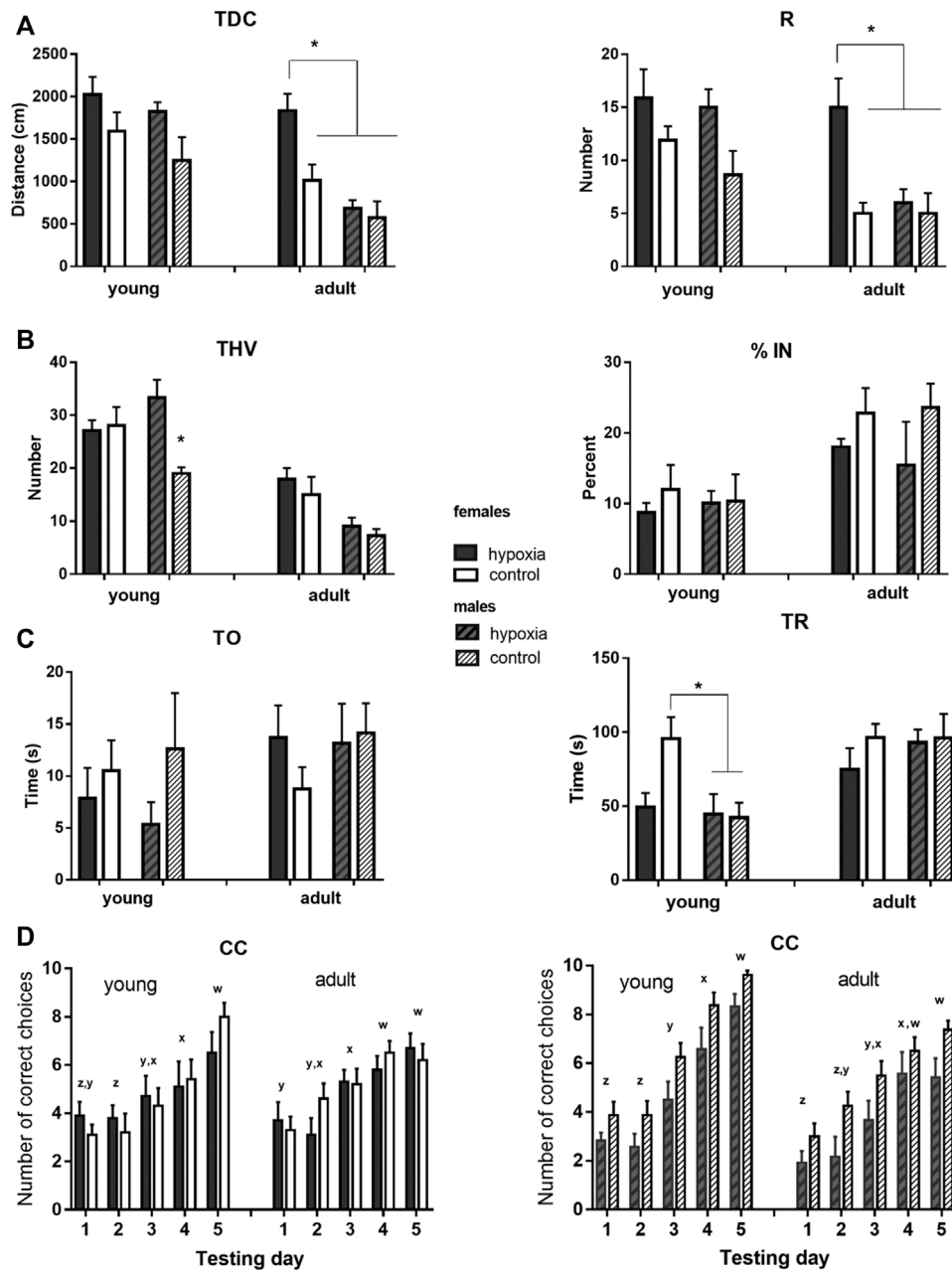
## Behavioral Alterations in Young and Adult Rats After Perinatal Hypoxia

The results of behavioral testing are shown in **Figure 4**, with numerical values and statistical parameters given in the Supplementary material (**Supplementary Tables 2, 3**).

In juvenile animals, the open field test revealed a significant influence of hypoxia on both, horizontal ( $p < 0.01$ ) and vertical ( $p < 0.05$ ) activity, with hypoxic rats displaying higher mean values for TDC and R than control rats (**Figure 4A**). In adult animals, compared to the juveniles, mean values of the measured

parameters decreased in all subgroups, except for hypobaric females. Consequently, the influence of sex became highly significant ( $p < 0.001$  for TDC and  $p < 0.01$  for R), and the influence of hypoxia remained significant ( $p < 0.01$  for TDC and  $p < 0.05$  for R) due to the significant differences between hypobaric and control females, but not males.

Exploratory behavior in a hole board, measured as THV, was significantly influenced by hypoxia ( $p < 0.05$ ), due to a significant difference between control and hypoxic males, but not females (**Figure 4B**). At adulthood, mean values decreased much more in males than in females, compared to the juvenile values, resulting in significantly higher exploratory behavior in females than in males ( $p < 0.001$ ), while the influence of hypoxia was no longer significant. Anxiety-like behavior, measured in juvenile and adult rats as the percentage of the visited inner holes (% IN), did not significantly differ between the control and hypoxic rats or between males and females in either juvenile or adult animals (**Figure 4B**).



**FIGURE 4** | Results of the behavioral testing in young and mature animals display altered behavior and cognition in juvenile and adult rats. The rats were exposed to a battery of behavioral tests at juvenile (adolescent) (P33-P41) and adult (P83-P91) ages, to examine whether any behavioral and cognitive differences were still present or had newly appeared in adulthood. **(A)** Locomotor activity was measured as the total distance covered (TDC) and the number of rearing times (R) in an open field. Two-way ANOVA revealed: for TDC, a significant influence of hypoxia in juveniles and of hypoxia, sex, and hypoxia-sex interaction in the adults; for R, there was a significant influence of hypoxia in juveniles and a significant influence of hypoxia and sex, with the indicative influence of hypoxia-sex interaction in the adults. **(B)** Exploratory behavior was measured as the total number of visited holes (THV), and anxiety-like behavior was measured as the percentage of visited inner holes (% IN) in a hole-board. Two-way ANOVA revealed: for THV, a significant influence of hypoxia and hypoxia-sex interaction in juveniles and a significant impact of sex in adults; for % IN, no significant influences. **(C)** Social behavior was measured as time spent exploring an object (TO) and time spent exploring a rat (TR) in a social choice apparatus. Two-way ANOVA revealed for TO, no significant influences; for TR, a significant influence of sex, and hypoxia x sex interaction, only in juveniles. **(D)** Learning abilities were measured in a T-maze separately for males and females, and as the number of correct choices (CC) in sessions of ten trials during five consecutive days. Repeated measure two-way ANOVA revealed: for males, a significant influence of hypoxia and time, in juveniles, and an indicative influence of hypoxia and a significant effect of time, in adults; for females, the analysis showed a significant influence of time, in both juveniles and adults. Results are shown as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM); Tukey's honestly significance post-hoc test was performed after establishing a significant/indicative hypoxia-sex interaction influence and values that significantly differ are marked with an \* **(A-C)**. Letters x-z are indicators of significant differences (different letters) or the lack of significant difference (same letters) in the mean number of correct choices among different testing days as revealed by Tukey's honestly significance post-hoc test **(D)**.

Social behavior was tested by measures of the amount of time that an animal spent exploring a novel object (TO) and exploring a conspecific (TR) (**Figure 4C**). TO was not influenced by hypoxia, sex, or their interaction at either juvenile or adult ages. Conversely, the influence of sex on TR was significant ( $p < 0.05$ ). Interestingly, while control females explored a conspecific significantly longer than control males, the mean values of hypoxic males and females were very similar. At an adult age, mean values of TR increased in hypoxic animals of both sexes and in control males, in comparison to juvenile values, while they remained similar in control females. As a result, no significant effect of hypoxia, sex, or their interaction was observed in adult animals.

Spatial learning was tested separately for males and females. In juvenile females (**Figure 4D** left), only the testing day significantly influenced the number of correct choices ( $p < 0.0001$ ), with significant improvements on day 3 vs. 2 and 5 vs. 4. In adult females, the number of correct choices still improved during testing days ( $p < 0.0001$ ), but the learning curve was less steep than in juveniles, with significant improvements observed only on day 4 vs. 3. In juvenile males (**Figure 4D** right), both hypoxia ( $p < 0.05$ ) and testing days ( $p < 0.0001$ ) significantly influenced the number of correct choices, with control pups being overall more successful than hypoxic pups, and days 3, 4, and 5 bringing significant improvements in comparison to the corresponding previous day. In adult males, testing days still significantly influenced the number of correct choices ( $p < 0.0001$ ), but the learning curve was also flattened, with more gradual improvement. While control rats still seemed to be more successful, the influence of hypoxia at an adult age became only indicative ( $p = 0.065$ ).

## Chronic Structural Changes in the Mature Cingulate Cortex

The thorough anatomical examination of mature brains of adult rats and the histological examination of the stained sections showed preserved gross morphology (**Figures 5a,c**), the maintenance of regular cortical lamination (**Figures 5A–D**), and an absence of observable pathological features or consequences of the perinatal hypoxia.

A closer examination of two areas of the cingulate cortex (**Figure 5**, black rectangles in (a) and (c); and higher magnification A–D”), the midcingulate area (MCC) (**Figure 5A,A–B”**) and the retrosplenial area (RSC) (**Figures 5C,C–D”**) disclosed differences in the extracellular matrix (ECM). A decrease of diffuse Wfa-positive ECM with a concomitant upregulation of PNN around a particular population of neurons (**Figures 5A’–D’**) was observable. The morphology of the individual PNN was also different due to more condensed and thicker Wfa staining around the soma, and proximal and basal dendrites, often including the axon-initial segment, in animals perinatally subjected to hypoxia (**Figures 6a’,b’,Farrow**). In the control animals, the PNN were thinner and primarily found around the cell bodies and proximal dendrites (**Figures 5A’–D’, 6a,a’,E**). In hypoxia-treated animals, the PNN were more numerous throughout the entire cortex, but especially

in layers II/III and V (**Figures 5A’–D’, 6a–b’**). The tremendous significance of the impact of the hypoxia was observed in the increase of PNN number in the MCC area ( $p < 0.0001$ ; **Figure 6A**) but was also highly statistically significant in the RSC ( $p = 0.0112$ ; **Figure 6A’**). The effect of the perinatal hypoxia on the PNN number was notable in both sexes (**Figures 6B,B’**).

Likewise, indication of downregulated parvalbumin-positive neuropil was observed consistently in the sections from animals subjected to perinatal hypoxia (**Figures 5A”–D”, 6c–d’**). At the same time, an increase of the parvalbumin-immunoreactivity of the soma of interneurons was found in layers III and V (**Figures 5A”–D”, 6c–d’**). The qualitative examination also showed smaller cell soma of PV in hypoxia-treated animals. However, this parvalbumin-reactivity was pronounced in the soma and in the proximal portion of the dendrites in hypoxia-treated animals (**Figures 6c–d’,E,F**). The most remarkable difference between groups was observed in the number of PV in the MCC and the RSC (**Figures 6C–D’**). The quantification of PV confirmed the statistically significant effect of moderate perinatal hypoxia on PV numbers in both areas ( $p < 0.0119$ ; **Figure 6, C–D** for MCC;  $p < 0.0012$ ; **Figures 6 C’,D’** for RSC). The effect of the hypoxia was notable for both sexes.

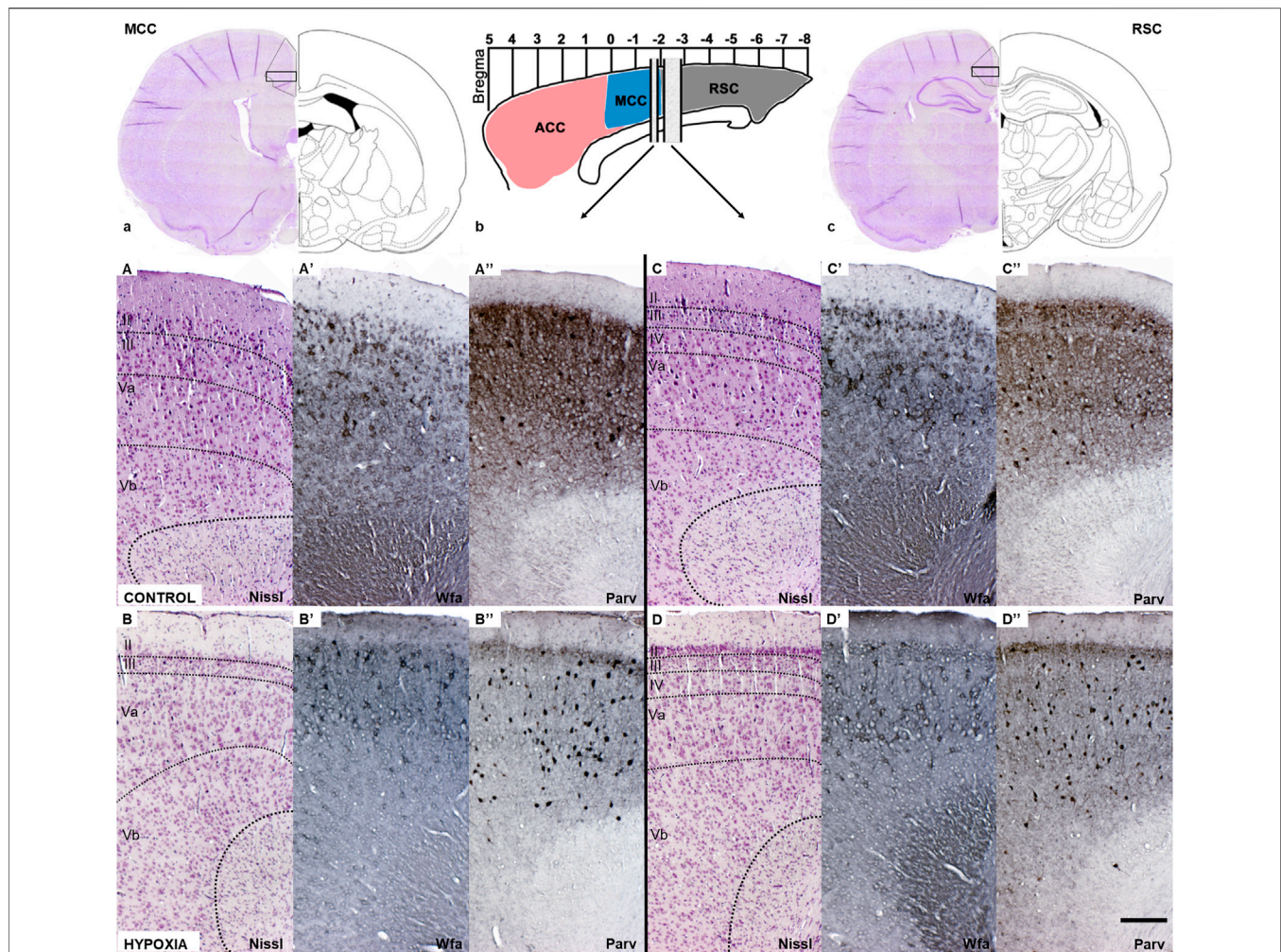
## DISCUSSION

At this time, in developed countries, early and late premature babies’ survival rate is very high due to good perinatal medical care. However, perinatal events, most often hypoxia, still cause considerable deficits in these children, from mild to severe motor, neurological, cognitive, or behavioral disorders, which are more prominent in early premature babies. Despite all the available experimental methodologies, the longitudinal research into the relationship between molecular, histological, and behavioral changes after perinatal hypoxic injury is still highly challenging in humans and in animal models. The moderate forms of perinatal brain hypoxia, in particular, have not been extensively investigated in animal models. However, it could be a key to understanding the cause-consequence relationship of factors in the pathophysiology of several disorders and therefore essential for improvements in perinatal preventive and therapeutic strategies.

Briefly, this study disclosed the impact of moderate perinatal hypoxia on the intricate cingulate cortex connectivity and related behavioral features in a rat model. Moderate, single-event hypoxia in the rat neonates affected the proliferative zones and cell maturation in the acute phase that caused chronic, long-lasting effects such as the expansion of perineuronal nets and parvalbumin interneurons in the mid and retrosplenial cingulate cortex, and alteration of learning and behavioral patterns, for life.

Most previous studies have focused on combined HI injuries or severe hypoxia, which are often accompanied by excessive brain tissue inflammation, necrosis, gliosis, scarification, with periventricular leukomalacia followed by motor deficits as a dominant outcome (Millar et al., 2017). However, as designed, severe hypoxic or hypoxic-ischemic brain injury cannot model subtle changes and details of the phenomena of vulnerability and





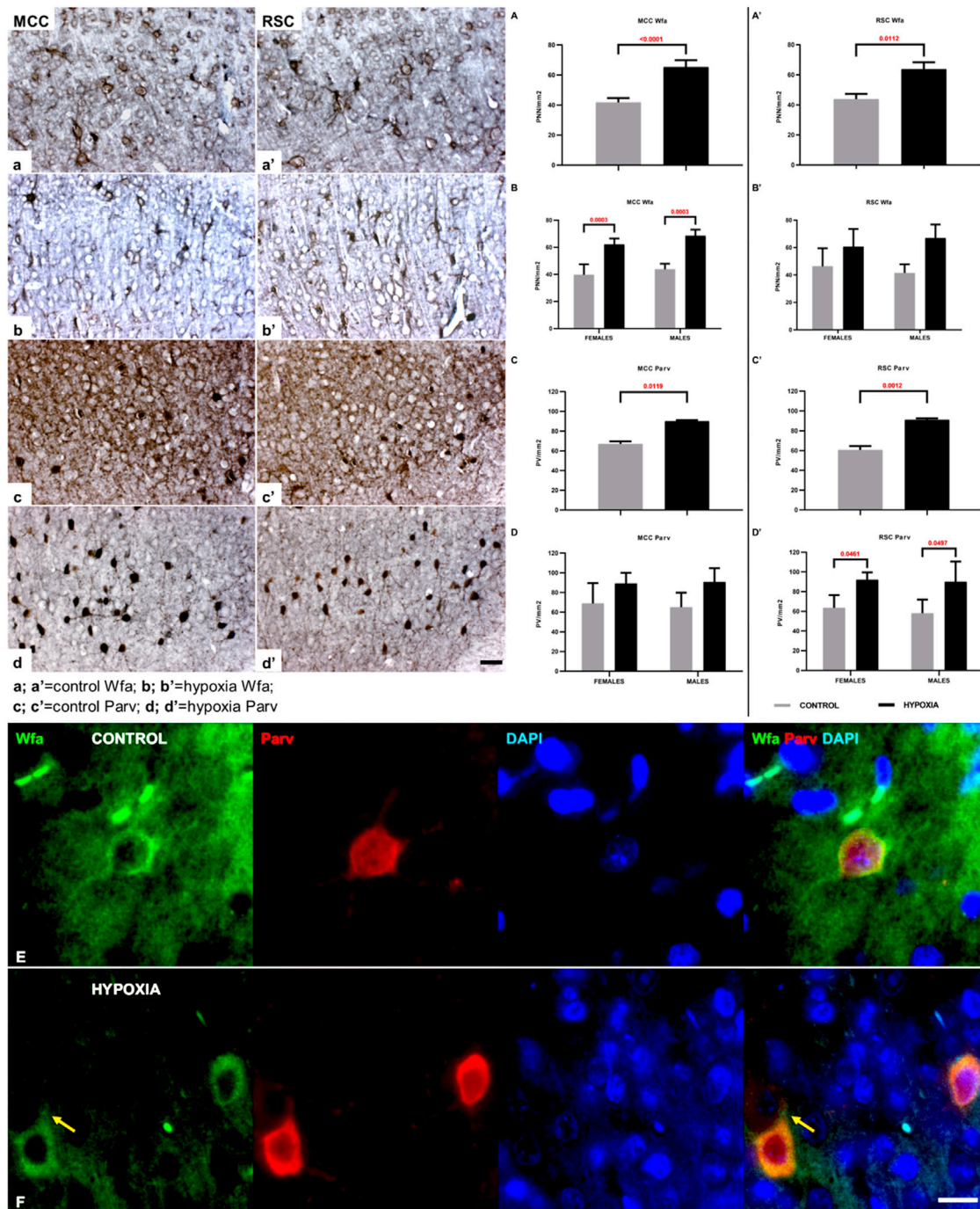
**FIGURE 5 |** Coronal sections of the mature cingulate cortex at the age of 3.5 months indicate a downregulation of the diffuse Wfa-positive ECM and parvalbumin-positive neuropil, and concomitant upregulation of PNN expression around some neurons and parvalbumin-immunoreactivity of the interneurons' soma in animals subjected to perinatal hypoxia. **(a)** Coronal section through cerebrum at the bregma level  $-1.56$  mm display medial cingulate cortex area (MCC). The black rectangle frame indicates the part of the cortex presented below with higher magnification. **(b)** Schematic presentation of the position of ACC, MCC, and RSC regarding bregma scale and the position from which below presented sections are isolated. **(c)** Coronal section through cerebrum at the level of bregma  $-2.76$  mm that displays retrosplenial cingulate cortex area (RSC). The black rectangle frame indicates the part of the cortex presented below with the higher magnification. **(A–D)** Coronal sections stained by cresylic-violet (Nissl modification) showing preserved gross morphology and proper cortical layering in the MCC and RSC in control and hypoxia-treated animals. **(A'–D')** Coronal sections histochemically stained with *Wisteria floribunda* agglutinin (Wfa) show difference in qualitative characteristics of extracellular matrix where Wfa-positive matrix is diffusely present in all cortical layers and in the form of PNN around some neurons of predominantly cortical layers III and V. In contrast, in the hypoxia-treated animals the Wfa-positive extracellular matrix is localized almost exclusively in the form of PNN. The PNN are most frequently around interneurons of layers II/III and even more in layer V, especially prominent in RSC, in hypoxia treated animals compared to controls. **(A''–D'')** Coronal sections through MCC and RSC stained with parvalbumin-immunohistochemistry (Parv) indicate downregulated diffuse parvalbumin expression in the cortical neuropil of animals subjected to perinatal hypoxia. However, interneurons' parvalbumin-positive soma were pronounced, especially in cortical layers II/III and V of these animals. Contrary, Parv-positive cingulate neuropil is pronounced in cortical layers II/III and V, but with less pronounced parvalbumin expressing interneurons in controls. The actual image magnification from **(A–D'')**, is shown with the scale bar in **(D'')** presenting  $200 \mu\text{m}$ .

plasticity because of the much broader extent of lesion that affects many different cell populations and developmental processes simultaneously.

In contrast, we modeled moderate brain hypoxia that demonstrated cognitive and behavioral impairment in animals without motor deficits and significant brain pathology. The presented study is comparative and complementary to severe models showing less reactive microglia, hemorrhagic, or

leukomalacia and so give better resolution in detecting affected developmental processes like proliferation, migration, axon elongation, synaptogenesis and ECM reorganization. Therefore, in this study, we investigated the immediate acute response to perinatal hypoxic injury, as the acid-base status, molecular (Hif-1 $\alpha$ , Cox 4-1, Cas 3), cellular (microglia), and structural (SVZ) hallmarks, in the first step. Secondly, in the longitudinal follow-up study, we correlated this injury to long-





**FIGURE 6** | The qualitative and quantitative differences in perineuronal nets (PNN) and parvalbumin-positive interneurons (PV) between control and hypoxia-treated animals at the age of 3.5 months confirm a permanent structural change in the connectivity of the cingulate cortex. **(a–b',A–B')** High magnification of cortical layers III–Va of MCC **(a,b)**, cortical layers III–Va of RSC **(a',b')**, both stained by Wfa, and quantitative findings for the number of PNN in all cortical layers of MCC **(A,B)** and RSC **(A',B')**. The PNN are more numerous in hypoxia-treated animals in both cingulate areas. The Wfa staining of PNN is denser and thicker around the soma and proximal portion of the dendrites after perinatal hypoxia **(b,b')** compared to controls **(a,a')**. **(A–B')** Two-way ANOVA revealed a significant influence of hypoxia on the number of PNN/mm<sup>2</sup>: **(A)** in the MCC (Hypoxia =  $F(1,12) = 72.46$ ;  $p < 0.0001$ ; Sex =  $F(1,12) = 3.641$ ;  $p = 0.0806$ ; Interaction =  $F(1,12) = 0.1863$ ;  $p = 0.6736$ ), and **(A')** in the RSC area (Hypoxia =  $F(1,9) = 10.11$ ;  $p = 0.0112$ ; Sex =  $F(1,9) = 0.01477$ ;  $p = 0.9059$ ; Interaction =  $F(1,9) = 0.7814$ ;  $p = 0.3997$ ). The hypoxia-treated animals of both sexes had a significantly higher number of PNN in the MCC area **(B)**, and the same, but insignificant, trend was observed in RSC area **(B')**. **(c–d')** High magnification of layers III–Va of MCC **(c,c')**, cortical layers III–Va of RSC **(d,d')** stained by parvalbumin, and quantitative findings for the PV in all cortical layers of MCC **(C,D)** and RSC **(C',D')**. The interneurons soma is strongly parvalbumin - positively stained as well as the proximal portion of the dendrites in the animals subjected to perinatal hypoxia **(d,d')** compared to controls **(c,c')**. Two-way ANOVA revealed a significant influence of hypoxia on the number of PV per mm<sup>2</sup>: **(C)** in the MCC (Hypoxia =  $F(1,12) = 8.770$ ;  $p =$

*(Continued)*

**FIGURE 6** | 0.0119; Sex = F (1.12) = 0.01956;  $p = 0.8911$ ; Interaction = F (1.12) = 0.1141;  $p = 0.7413$ , and **(C')** in the RSC area (Hypoxia = F (1.12) = 17.84;  $p = 0.0012$ ; Sex = F (1.12) = 0.2751;  $p = 0.6095$ ; Interaction = F (1.12) = 0.05901;  $p = 0.8122$ ). The hypoxia-treated animals of both sexes had a significantly higher number of PV interneurons in the RSC area **(D')**, while in the MCC area **(D)**, the difference is only indicative. Data are shown as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) (error bars). **(E)** A representative PNN (Wfa-positive, green) is visible around the cell body of PV (Parv, red) as a thin coat. The PV of the control animal also has larger soma when compared with PV in hypoxia-treated animal. **(F)** Representative PNNs (Wfa-positive, green) in the brain section of hypoxia-treated animal, show thicker and denser ECM-coat around the cell soma, surrounding the proximal portion of the dendrites, and often the initial axon segment [**(F)**; arrow]. The PV stained with parvalbumin (Parv, red) reveals the smaller neurons soma in the cingulate cortex of hypoxia-treated animal compared to control. The actual image magnification for **(a-d')** is shown with the scale bar in **(d')**, presenting 50  $\mu\text{m}$ , for **(E,F)** is shown with the scale bar in **(F)**, presenting 25  $\mu\text{m}$ .

term brain connectivity changes by examining cognitive and behavioral outcomes. Thirdly, we investigated the structural substrate in the brain for the found functional alteration. Finally, the study design provided proof of the concept of presumed high vulnerability to synaptogenesis demonstrated in a subpopulation of cells that influenced the formation of local neuron circuitries relevant to decision making, emotional learning, memory, and visual-spatial orientation functions.

## The Acute Molecular and Cellular Effect on Brain Development

The immediate effect of our moderate generalized hypoxia in rat pups was an increase of lactate in the blood of neonates. Increased lactate value in the circulation is a product of anaerobic metabolism in all high-oxygen-demanding tissues and thus brain tissue (Kraut and Madias, 2014). However, lactate is also considered a neuroprotective factor due to the neonatal brain's high capacity to use lactate as an energy source. This assumption is based on two findings. The first one is the higher level of expression of monocarboxylate transporters and the concomitantly lower level of glucose transporters compared to the adult brain (Dumont et al., 2021; Roumes et al., 2021). The second finding is the metabolic cooperation called the astrocyte-neuron lactate shuttle, where the astrocytes fulfill neuronal energy needs using lactate (Pellerin and Magistretti, 2012). In that respect, the detected gradual increase of the Hif-1 $\alpha$  expression in the brain, most notable 24 h after hypoxia, confirmed that a subset of brain cells was vulnerable, injured and responded to the hypoxic insult by an Hif-1 $\alpha$  elevated expression. Still, the injury was not of such an extent to be statistically significant, as has been demonstrated in other studies (Semenza, 2000; Kaur et al., 2006). In addition, we found a statistically significant decrease of Cox 4-1 expression in hypoxia-treated animals 24 h after hypoxia. This finding supports previous claims of an increased Cox 4-1 proteolysis *via* the Hif-1 $\alpha$  -induced mitochondrial protease activity found in hypoxic conditions (Fukuda et al., 2007). Jointly, these findings favor the idea of possible damage of oxidative processes in cells. Previously shown increases in Cas-3 activation, as early as 1 h post hypoxia (Wang et al., 2001), and lasting up to 6 days after injury, were shown as consequences of severe brain hypoxia and deterioration, which was not the case in our model. Thus, we may conclude that, in our non-invasive hypoxia model, the moderate brain injury could be confirmed by an acute, significant decrease of Cox 4-1, and an increase of Hif-1 $\alpha$  as markers of impaired cell oxygenation. Still, the hypoxia itself was insufficient to cause enhanced developmental apoptosis,

nor did it provoke “*de novo*” excessive cell death or any other pathological changes. The observed differences in the morphology of microglia between animals perinatally subjected to hypoxia and control animals in the cortex and the SVZ is further evidence supporting the presence of moderate injury. In our model, the morphology and number of the CD68 or Iba1 positive cells indicate mild microglial activation, likely provoked by enhanced developmental phagocytosis and remediation. It has been shown previously that, at P0, the majority of microglial cells in the white matter are rounded and amoeboid (as the microglia of the corpus callosum in our study); at P3, the cells develop broad stubby processes, which leads to the further development of processes at P7, and finally, a reduction in the number of microglia cells that occurs at P14 (Hristova et al., 2010). The microglial phagocytosis is fundamental for neural development (Fisch et al., 2020), with amoeboid microglia primarily present in the white matter, which was also observed (shown with the Iba1 immunostaining) in the corpus callosum of our model. The CD68 microglial cells located in the SVZ are largely phagocytic (Hristova et al., 2010; Shigemoto-Mogami et al., 2014; Fisch et al., 2020; Dumont et al., 2021), and, in our case, their increase suggests increased phagocytic activity associated with impaired proliferation and cell oxygenation, as evidenced by lower SVZ cell density. The ramified Iba1 positive microglia cells with processes that extended the diameter of the microglial soma more than two-fold, were observed within the CG, and in the SVZ 24 h after subjection to hypoxia, indicating precocious maturation of some microglial cells, similar to findings reported in periventricular white matter injury (Hristova et al., 2010).

## The Long-Lasting Signature of Perinatal Hypoxia on Cortical Connectivity and Behavior

The ECM has been shown to play an important role in brain development, being one of the major or key building constituents of transient fetal brain structures (such as preplate, subplate, marginal zone, crossroads of axonal pathways, perinatally remnants of subplate) that precede the establishment of cortical lamination and connectivity in the human brain (Kostović et al., 2014a, 2014b; Milošević et al., 2014; Milos et al., 2020). The ECM is the fourth constituent of the quadripartite synapse (presynaptic, postsynaptic, glial and ECM elements; reviewed in Sykova and Nicholson, 2008). The specialized condensed ECM known as PNN are critical in synaptogenesis, synapse maturation and maintenance, and

ultimately, in plasticity after injury (for reviews, see Kwok et al., 2014; Sorg et al., 2016; Nalivaeva et al., 2018; Shen, 2018; Duncan et al., 2019; Fawcett et al., 2019; Van't Spijker et al., 2019; Carulli and Verhaagen, 2021). Several studies have investigated specifically, the changes in PNN after severe HI in adult animals and have shown that HI injury causes decomposition of PNN in infarcted neocortical areas (Härtig et al., 2017; Wen et al., 2018). The experience-dependent synaptic plasticity in adulthood relies particularly on PNN around fast-spiking PV within many brain regions (Wang and Fawcett, 2012; Sorg et al., 2016). The PNN show region-specific features (Ueno et al., 2017a; Ueno et al., 2017b; Ueno et al., 2018) and vulnerability, as evidenced in a variety of neurological and psychiatric disorders (Nalivaeva et al., 2018; Wen et al., 2018; Fawcett et al., 2019; Carulli and Verhaagen, 2021). We were interested to see whether moderate perinatal hypoxia executed before the complete differentiation of the ECM, PNN, and PV, still affects PNN formation, number, and/or distribution, regardless of whether it is a consequence of injury or plasticity response. Determining whether these changes in ECM organization in the brains of animals that underwent perinatal hypoxia could lead to altered behavior or learning abilities later, in adolescence or adulthood, was of no less interest and importance. It would be also interesting to test in the future a life-long effect of perinatally occurring hypoxia, possible alterations of PV and PNN connectivity and behavior since astrocyte and microglia activity were shown up to 2 years after ischemic reperfusion insult (Sekeljic et al., 2012; Radenovic et al., 2020).

This study disclosed qualitative differences in the morphology and distribution of PNN and PV, with a significant increase in the density of PNN and PV in the hypoxia-treated animals of both sexes, in two areas of interest: the MCC and RSC. Other studies have also shown an increased number of PNN after: sleep deprivation and oxidative stress in PV neurons (Harkness et al., 2019); acquisition of auditory fear memory in the hippocampus, auditory cortices, and anterior cingulate cortex (ACC) (Banerjee et al., 2017; Shi et al., 2019); formation of cocaine-related preference memories [around cerebellar Golgi neurons (Carbo-Gas et al., 2017)]; and after repeated cocaine administration (Slaker et al., 2018). The PNN protect neurons from oxidative stress, as shown in several studies (Cabungcal et al., 2013; Suttkus et al., 2014), but simultaneously they are susceptible to such stress, as well (Cabungcal et al., 2013). The enzymatic removal of PNN generally increases the reverse-learning required for behavioral flexibility (Happel et al., 2014). In the cerebellar nuclei, enzymatic removal of PNN results in better motor-associative learning (Carulli et al., 2020). In the hippocampus, the removal of PNN reverses learning deficits (Bertocchi et al., 2021). Since we found changes in the number of PNN in the MCC and the RSC, it is worth mentioning that the putative role of MCC is to connect the ACC and the RSC in relevant learning by the selection of different learning pathways and patterns. The MCC also is important in decision-making and emotional learning (Vann and Aggleton, 2005; Lukoyanov and Lukoyanova, 2006; Vogt and Paxinos, 2014). Spatial navigation, learning of reward-based tasks, regulation of emotional responsiveness to new situations, as

well as memory, and learning by visual cues are attributed to the RSC (Cooper and Mizumori, 2001; Vann and Aggleton, 2005; Lukoyanov and Lukoyanova, 2006; Vogt and Paxinos, 2014). In our model, hypoxia affected two of the three main aspects of novel space exploration. Locomotor activity was significantly affected in juveniles of both sexes and adult females. Exploratory behavior was significantly affected in juvenile males, while thigmotaxic behavior was not affected. That implies that affected connectivity after neonatal hypoxia induces long-lasting hyperactivity without affecting anxiety level. Most studies used either one sex or both sexes in a single group, preventing the identification of possible sex-specific vulnerability to hypoxia. In contrast, this study showed that significant hyperactivity was transitory for males, while females remained equally hyperactive in adulthood, suggesting higher vulnerability. Differential male/female vulnerability to hypoxia found in the social-choice test, which showed that hypoxia attenuated sex differences in sociability that initially existed, was additional supporting evidence. Previous studies also report hyperactivity measured as an increase in ambulation and/or rearing, in juvenile rats after exposure to intermittent postnatal hypoxia at days P7-10 (Decker et al., 2003; Decker et al., 2005), or mild chronic hypoxia at P10 (Mikati et al., 2005) and to neonatal anoxia (Shimomura and Ohta, 1988; Buwalda et al., 1995; Iuvone et al., 1996). In addition to transitory hyperactivity (Shimomura and Ohta, 1988; Iuvone et al., 1996), long-lasting learning impairments have been considered one of the hallmarks of hypoxia in young (Raveendran and Skaria, 2012) and adult rats (Buwalda et al., 1995; Iuvone et al., 1996; Decker et al., 2003; Mikati et al., 2005; Galeano et al., 2014), as was also confirmed in our study for moderate perinatal hypoxia. Although more studies are required before drawing a firm conclusion, we can assume that the increase in PNN and PV could have been responsible for limited synaptic plasticity in the cingulate cortex, consequent hyperactivity, and restriction of cognitive functions in our model. In other words, developmentally altered PNN-synapse formation that is associated with a specific neuron population, in fact, highlights lesions that affect connectivity function, as evidenced by behavior alterations. In its more pronounced form, developmentally disturbed PNN-related connectivity may account for cognitive or behavioral disorders, such as schizophrenia, bipolar disorder, major depression, or the autism spectrum. Developmentally unfavorable conditions such as hypoxia during midgestation in the human or neonatal rats may also reduce the electric activity of the early microcircuits in the subplate zone (for review, Molnar et al., 2020). Therefore, a further research focus in this model may be the vulnerability of subplate and/or layer 6b neurons. The lesions of these neurons affect the development of thalamocortical and corticothalamic connections that may be the substrate of subsequent challenging conditions as cognitive, psychiatric, or neurological disorders (McQuillen et al., 2003; Sheikh et al., 2019; Molnar et al., 2020).

Our model may have comparative and complementary advantages and potential in researching the pathogenesis of these disorders of a neurodevelopmental origin.



**TABLE 1 |** List of primary and secondary antibodies used in Western blot and immunohistochemistry.

Primary antibodies (clone)	Cat. No.	Host, isotype, format	Dilution	Supplier
Hif 1 alpha antibody (H1alpha67)	NB100-105	Mouse monoclonal Protein G purified	1:500	Novus biologicals, Centennial, Colorado, US
Cox 4-1	AF5814	Goat polyclonal unconjugated	1:200	R&D systems Minneapolis, Minnesota, US
Cleaved caspase-3 (Asp175)	9661	Rabbit polyclonal	1:1,000	Cell signaling, Leiden, Netherlands
Microglia marker anti Iba-1	019-19741	Rabbit	1:1,000	FujiFilm wako chemicals, US
CD68	MCA341R	Mouse monoclonal purified	1:200	Biorad, Hercules, California US
Anti-parvalbumin antibody	ab11427	Rabbit polyclonal unconjugated	1:2,000	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Biotinylated wisteria floribunda agglutinin (Bio-Wfa)	L1516	—	diluted 6 µg on 1 ml	Sigma—Aldrich, Saint Louis, US
Fluorescein wisteria floribunda lectin (Wfa, Wfl)	FL-1351	—	diluted 5 µg on 1 ml	Vector laboratories, Inc., Burlingame, US
Secondary antibodies	Cat. No.	Host, isotype, format	Dilution	Supplier
Peroxidase-affiniPure secondary antibody	705-035-003	Donkey anti-goat IgG (H + L)	1:50,000 1:200	Jackson immunoresearch, Ely, United Kingdom
Peroxidase-affiniPure secondary antibody	711-035-152	Donkey anti-rabbit IgG (H + L)	1:50,000 1:200	Jackson immunoresearch, Ely, United Kingdom
Alexa fluor 488, highly cross-adsorbed secondary antibody	A21206	Donkey anti-rabbit IgG (H + L)	1:1,000	Thermo fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US
Alexa fluor 546, highly cross-adsorbed secondary antibody	A10040	Donkey Anti-Rabbit IgG (H + L)	1:1,000	Thermo fisher scientific, Waltham, Massachusetts, US
Alexa fluor 647, highly cross-adsorbed secondary antibody	A21447	Donkey Anti-Goat IgG (H + L)	1:1,000	Thermo fisher scientific, Waltham, Massachusetts, US

## CONCLUSION

The unique study model of perinatal brain injury enabled the assessment of behavioral and learning alterations and subsequent detection of related changes in the quality and number of PNN and PV after moderate non-invasive hypoxia. This research confirms the resistance of the immature brain to hypoxia. However, when excessive, even a single perinatal hypoxic event disturbs the proliferation in the SVZ and the ongoing organization of the ECM relevant for the synaptogenesis, synapse maturation, and synaptic plasticity in interneurons. A very plausible consequence of such an event might be a detrimental effect on cortical circuitries and connectivity; thus, increased cognitive vulnerability and altered neural functions that become manifest under demanding conditions or later in life.

As such, this research design provides a better understanding of the brain's cellular and extracellular substrate of vulnerability to perinatal hypoxic injury and the relationship to long-term behavioral and cognitive outcomes. In addition, this model shows excellent potential for research into predisposing factors accountable for neurological or neuropsychiatric conditions. Thus, the perinatal vulnerability of synaptogenesis seems to be the basis for altered structural and behavioral features later in life. Therefore, we believe this model is most suitable for research into neurological and psychiatric conditions of developmental (fetal

or early postnatal) origin. Further research in comparative and translational studies on this model in rats is expected to provide new insights into possible prevention strategies and therapeutic targets to alleviate or treat the consequences of developmental brain lesions in humans.

## MATERIALS AND METHODS

All animal experiments comply with the ARRIVE guidelines and have been carried out following the United Kingdom. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986, EU Directive 2010/63/EU, Croatian regulations, and associated documents (NN 102/2017 and 32/19; NN 55/2013 and 39/17) for experimentations on animals. The study design and experiments were approved by the Ethical Committee of the University of Zagreb and national Ethical and Animal welfare bodies (EP231/2019; UP/I-322-01/19.01/75). Every effort was made to reduce the number of animals in use and to minimize animal discomfort. The sex of animals is indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the study results. The minimum number of needed animals (82) was determined by power analysis, and animals were randomly assigned to the hypoxic or control group, always maintaining equal sex representation. The timeline of the study design is presented in **Figure 1**

(**Figure 1A**). All methods used in the study are described in detail in the **Supplementary Material**.

## Experimental Subjection to Hypoxia

The Wistar Han (RccHan: WIST) rat pups at postnatal day 1 (P1) were weighed, sex determined and marked by a permanent toe tattoo (NEO-9 Neonate Tattoo System, AgnTho's AB, Sweden). The day of birth is considered P0 until the noon of the next day after which P1 starts. The hypoxic group (3F+3M per session) was placed in a hypoxic chamber (diameter of chamber: 300 mm; volume of chamber: 12,9L) with litter bedding, at 27°C, with a partial pressure of oxygen ( $pO_2$ ) of 73 mmHg and an atmosphere pressure ( $p^{ATM}$ ) of 350 mmHg, for 2 h. The control group (3F+3M per session) was exposed to a  $pO_2$  of 159 mmHg and a  $p^{ATM}$  of 760 mmHg, with other parameters the same as the hypoxic group. The average weight of animals used for experimental purposes was 6.88g  $\pm$  10%. The hypoxia model is designed by modifying the previously described protocol (Kaur et al., 2006). After the procedure, the rat pups were used for acid-base status measurement or were returned to their dams and used later in the study (see timeline in **Figure 1A**).

## Acid-Base Status Measurement

Immediately after the experimental hypoxia, six pups per group were decapitated. The blood was collected in mini capillary tubes (75  $\mu$ L per animal, separately) for instant analysis of the acid-base status using i-STAT Alinity gas analyzer (Abbott, CG4+ test Cartridge). The pH (hydrogen potential),  $pCO_2$  (partial pressure of carbon dioxide),  $pO_2$  (partial pressure of oxygen), BE, ecf (base excess in the extracellular fluid),  $HCO_3^-$  (bicarbonate),  $sO_2$  (oxygen saturation),  $TCO_2$  (total carbon dioxide), and lactate were measured in all blood samples.

## Western Blot, Histology, Immunohistochemical Methods, and Quantification

For the Western blot method (WB), six pups per group were anesthetized by body cooling [ $+4^\circ C/2$  min; (Phifer and Terry, 1986)] and decapitated 2, 8, or 24 h after subjection to hypoxia, and the brains were snap-frozen. Primary and secondary antibodies used for protein detection in WB and immunohistochemistry are listed in **Table 1**. The WB and protein analysis were performed as described previously (Herrera-Molina et al., 2017).

The brain structure was analyzed on coronal sections, cryo-sections 60  $\mu$ m thick for P1, and paraffin 14  $\mu$ m thick for P105, stained by cresyl-violet (modification by Nissl: 0.5% Cresyl violet, Chemika, Girraween, NSW, Australia). The differential expression of specific proteins was examined by immunofluorescent (IF; free-floating 60  $\mu$ m thick cryo-sections for P1; glass-mounted 14  $\mu$ m thick sections for P105) and classic non-fluorescent (IHC) (free-floating 60  $\mu$ m thick cryo-sections for P1; glass-mounted 14  $\mu$ m thick sections for P105) staining as described in our previous publications (Bobić Rasonja et al., 2019; Culjat and Milošević, 2019), and given in more details in the **Supplementary Material**.

The number of PNN and parvalbumine-positive interneurons (PV) were counted in the cingulate cortex at the levels of the bregma  $-1.56$  mm to bregma  $-1.92$  mm for the midcingulate area (MCC), and bregma  $-2.04$  mm to bregma  $-2.92$  mm for the retrosplenial area (RSC) (Paxinos and Watson, 2007). The quantitative analysis (eight animals per group) was performed using Neurolucida 10 (MBF-Bioscience, Williston, ND, United States), and an Olympus BX61 microscope as described previously (Bicanic et al., 2017).

## Behavioral Testing

Forty rats were submitted to open-field, hole-board, T-maze, and social choice tests as described previously (Blazevic et al., 2012). Briefly, horizontal locomotor activity (total distance covered in cm, TDC), and the number of rearing times (R) were tested in the open field for 5 minutes. Exploratory and thigmotactic behaviors were tested in a hole-board as the total number of holes (THV), and the percentage of the inner holes (% IN) visited for 5 minutes. Learning was tested in a T-maze as the number of correct choices in 10 consecutive trials during five successive days. Sociability was tested as the amount of time spent exploring an inanimate object (TO, in seconds) and a conspecific (TR, in seconds) for 5 minutes. Rats were tested according to the same protocol at P30 and P70.

## Statistical Analysis

All statistical tests were conducted using Prism8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, United States) and JMP 11.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, United States). Due to the small number of samples, it was not possible to reliably prove the normality of the distribution for analysis of the acid-base status, so we decided to use an unpaired, two-tailed, nonparametric Mann-Whitney test. An unpaired, two-tailed, Student's t-test was used to examine the difference between groups in protein quantity on Western blots. An independent two-way ANOVA was used to check for the influences of hypoxia and gender on behavioral parameters and on the number of PNN and PV. The univariate split-plot approach for repeated measures ANOVA was used to analyze the influences of experimental hypoxia (between-subject variable) and testing day (within-subject variable) on the number of correct choices in the T-maze test. Tukey's honest significance test was used for post-hoc analyses. The level of significance was set to 0.05 (two-tailed  $p$  value). Values in the text were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author.

## ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Ethical Committee of the University of Zagreb (UP/I-322-01/19.01/75) and the national Ethical and Animal welfare bodies (EP231/2019)

at the Veterinary and Food Safety Directorate, Ministry of Agriculture, Croatia.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

ST and KI modified and performed hypoxia experiments; BN and DH performed and evaluated the animals' behavior; KI performed and evaluated the Western blot experiments; MD, ST, MB-R assessed the acid-base status; ST, SD, ZP, NJ-M analyzed the IHC/IF results. ST, BN, MD, SD, and DH performed the statistical analysis. ST, BN, KI, MD, DH, NJ-M drafted the first manuscript. All authors participated in interpretation of the results, discussions, critical editing and have approved the final manuscript; Conceptualization, study design and funding acquisition by NJ-M.

## FUNDING

The research was co-financed by CSF-project “Brain extracellular matrix in development and in perinatal hypoxia” (acronym—BrainECM, IP-2019-04-3182); the University of

Zagreb School of Medicine project “Reorganisation of the extracellular matrix in the frontal lobe”, BM0054; and the Scientific Centre of Excellence for Basic, Clinical and Translational Neuroscience, project “Experimental and clinical research of hypoxic-ischemic damage in perinatal and adult brain”; GA KK01.1.1.01.0007 funded by the European Union through the European Regional Development Fund.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Academician Ivica Kostović, Pierre Gressens and Miloš Judaš for the critical review of the article and valuable suggestions for its substantial improvement. The authors would also like to thank Danica Budinščak, Božica Popović and Maja Horvat for their excellent technical support.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.810980/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Alexander, M., Garbus, H., Smith, A. L., Rosenkrantz, T. S., and Fitch, R. H. (2014). Behavioral and Histological Outcomes Following Neonatal HI Injury in a Preterm (P3) and Term (P7) Rodent Model. *Behav. Brain Res.* 259, 85–96. doi:10.1016/j.bbr.2013.10.038
- Ball, G., Seidlitz, J., O'Muircheartaigh, J., Dimitrova, R., Fenchel, D., Makropoulos, A., et al. (2020). Cortical Morphology at Birth Reflects Spatiotemporal Patterns of Gene Expression in the Fetal Human Brain. *Plos Biol.* 18, e3000976. doi:10.1371/journal.pbio.3000976
- Banerjee, S. B., Gutzzeit, V. A., Baman, J., Aoued, H. S., Doshi, N. K., Liu, R. C., et al. (2017). Perineuronal Nets in the Adult Sensory Cortex Are Necessary for Fear Learning. *Neuron* 95, 169–179. e3. doi:10.1016/j.neuron.2017.06.007
- Batalle, D., Hughes, E. J., Zhang, H., Tournier, J.-D., Tusor, N., Aljabar, P., et al. (2017). Early Development of Structural Networks and the Impact of Prematurity on Brain Connectivity. *Neuroimage* 149, 379–392. doi:10.1016/j.neuroimage.2017.01.065
- Bertocchi, I., Mele, P., Ferrero, G., Obero, A., Carulli, D., and Eva, C. (2021). NPY-Y1 Receptor Signaling Controls Spatial Learning and Perineuronal Net Expression. *Neuropharmacology* 184, 108425. doi:10.1016/j.neuropharm.2020.108425
- Bicanic, I., Hladnik, A., and Petanjek, Z. (2017). A Quantitative Golgi Study of Dendritic Morphology in the Mice Striatum Medium Spiny Neurons. *Front. Neuroanat.* 11, 1–10. doi:10.3389/FNANA.2017.00037
- Bitanirwe, B. K. Y., and Woo, T.-U. W. (2014). Perineuronal Nets and Schizophrenia: The Importance of Neuronal Coatings. *Neurosci. Biobehavioral Rev.* 45, 85–99. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.03.018
- Blazevic, S., Colic, L., Culig, L., and Hranilovic, D. (2012). Anxiety-like Behavior and Cognitive Flexibility in Adult Rats Perinatally Exposed to Increased Serotonin Concentrations. *Behav. Brain Res.* 230, 175–181. doi:10.1016/j.bbr.2012.02.001
- Bočić Rasonja, M., Orešković, D., Knezović, V., Pogledić, I., Pupačić, D., Vukšić, M., et al. (2019). Histological and MRI Study of the Development of the Human Indusium Griseum. *Cereb. Cortex* 29, 4709–4724. doi:10.1093/cercor/bhz004
- Buwalda, B., Nyakas, C., Vosselman, H. J., and Luiten, P. G. M. (1995). Effects of Early Postnatal Anoxia on Adult Learning and Emotion in Rats. *Behav. Brain Res.* 67, 85–90. doi:10.1016/0166-4328(94)00108-R
- Cabungcal, J.-H., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T. K., et al. (2013). Perineuronal Nets Protect Fast-Spiking Interneurons against Oxidative Stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 9130–9135. doi:10.1073/pnas.1300454110
- Carbo-Gas, M., Moreno-Rius, J., Guarque-Chabrera, J., Vazquez-Sanroman, D., Gil-Miravet, I., Carulli, D., et al. (2017). Cerebellar Perineuronal Nets in Cocaine-Induced Pavlovian Memory: Site Matters. *Neuropharmacology* 125, 166–180. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.07.009
- Carulli, D., Broersen, R., de Winter, F., Muir, E. M., Mešković, M., de Waal, M., et al. (2020). Cerebellar Plasticity and Associative Memories Are Controlled by Perineuronal Nets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117, 6855–6865. doi:10.1073/pnas.1916163117
- Carulli, D., and Verhaagen, J. (2021). An Extracellular Perspective on CNS Maturation: Perineuronal Nets and the Control of Plasticity. *Ijms* 22, 2434. doi:10.3390/ijms22052434
- Clowry, G. J., Basuodan, R., and Chan, F. (2014). What Are the Best Animal Models for Testing Early Intervention in Cerebral Palsy? *Front. Neurol.* 5, 258. doi:10.3389/fneur.2014.00258
- Cooper, B. G., and Mizumori, S. J. Y. (2001). Temporary Inactivation of the Retrosplenial Cortex Causes a Transient Reorganization of Spatial Coding in the Hippocampus. *J. Neurosci.* 21, 3986–4001. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-11-03986.2001
- Culjat, M., and Milošević, N. J. (2019). Callosal Septa Express Guidance Cues and Are Paramedian Guideposts for Human Corpus Callosum Development. *J. Anat.* 235, 670–686. doi:10.1111/joa.13011
- Decker, M. J., Hue, G. E., Caudle, W. M., Miller, G. W., Keating, G. L., and Rye, D. B. (2003). Episodic Neonatal Hypoxia Evokes Executive Dysfunction and Regionally Specific Alterations in Markers of Dopamine Signaling. *Neuroscience* 117, 417–425. doi:10.1016/S0306-4522(02)00805-9
- Decker, M. J., Jones, K. A., Solomon, I. G., Keating, G. L., and Rye, D. B. (2005). Reduced Extracellular Dopamine and Increased Responsiveness to novelty: Neurochemical and Behavioral Sequelae of Intermittent Hypoxia. *Sleep* 28, 169–176. doi:10.1093/sleep/28.2.169
- Defelipe, J., López-Cruz, P. L., Benavides-Piccione, R., Bielza, C., Larrañaga, P., Anderson, S., et al. (2013). New Insights into the Classification and Nomenclature of Cortical GABAergic Interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 202–216. doi:10.1038/nrn3444
- Deidda, G., Bozarth, I. F., and Cancedda, L. (2014). Modulation of GABAergic Transmission in Development and Neurodevelopmental Disorders: Investigating Physiology and Pathology to Gain Therapeutic Perspectives. *Front. Cel. Neurosci.* 8, 1–23. doi:10.3389/fncel.2014.00119

- Dumont, U., Sanchez, S., Repond, C., Beauvieux, M.-C., Chateil, J.-F., Pellerin, L., et al. (2021). Neuroprotective Effect of Maternal Resveratrol Supplementation in a Rat Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Front. Neurosci.* 14, 342–358. doi:10.3389/fnins.2020.616824
- Duncan, J. A., Foster, R., and Kwok, J. C. F. (2019). The Potential of Memory Enhancement through Modulation of Perineuronal Nets. *Br. J. Pharmacol.* 176, 3611–3621. doi:10.1111/bph.14672
- Fawcett, J. W., Oohashi, T., and Pizzorusso, T. (2019). The Roles of Perineuronal Nets and the Perinodal Extracellular Matrix in Neuronal Function. *Nat. Rev. Neurosci.* 20, 451–465. doi:10.1038/s41583-019-0196-3
- Ferguson, B. R., and Gao, W.-J. (2018). Pv Interneurons: Critical Regulators of E/I Balance for Prefrontal Cortex-dependent Behavior and Psychiatric Disorders. *Front. Neural Circuits* 12, 1–13. doi:10.3389/fncir.2018.00037
- Filice, F., Vörckel, K. J., Sungur, A. Ö., Wöhr, M., and Schwaller, B. (2016). Reduction in Parvalbumin Expression Not Loss of the Parvalbumin-Expressing GABA Interneuron Subpopulation in Genetic Parvalbumin and Shank Mouse Models of Autism. *Mol. Brain* 9, 1–17. doi:10.1186/s13041-016-0192-8
- Fisch, U., Brégère, C., Geier, F., Chicha, L., and Guzman, R. (2020). Neonatal Hypoxia-Ischemia in Rat Elicits a Region-specific Neurotrophic Response in SVZ Microglia. *J. Neuroinflammation* 17, 26. doi:10.1186/s12974-020-1706-y
- Franz, A. P., Bolat, G. U., Bolat, H., Matijasevich, A., Santos, I. S., Silveira, R. C., et al. (2018). Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Very Preterm/Very Low Birth Weight: A Meta-Analysis. *Pediatrics* 141, e20171645. doi:10.1542/peds.2017-1645
- Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J.-w., Shimoda, L., Dang, C. V., and Semenza, G. L. (2007). HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells. *Cell* 129, 111–122. doi:10.1016/j.cell.2007.01.047
- Galeano, P., Blanco, E., Logica Tornatore, T. M. A., Romero, J. I., Holubiec, M. I., Rodríguez de Fonseca, F., et al. (2014). Life-long Environmental Enrichment Counteracts Spatial Learning, Reference and Working Memory Deficits in Middle-Aged Rats Subjected to Perinatal Asphyxia. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 406. doi:10.3389/fnbeh.2014.00406
- Gandal, M. J., Nesbitt, A. M., McCurdy, R. M., and Alter, M. D. (2012). Measuring the Maturity of the Fast-Spiking Interneuron Transcriptional Program in Autism, Schizophrenia, and Bipolar Disorder. *PLoS One* 7, e41215–8. doi:10.1371/journal.pone.0041215
- Happel, M. F. K., Niekisch, H., Castiblanco Rivera, L. L., Ohl, F. W., Deliano, M., and Frischknecht, R. (2014). Enhanced Cognitive Flexibility in Reversal Learning Induced by Removal of the Extracellular Matrix in Auditory Cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 2800–2805. doi:10.1073/pnas.1310272111
- Harkness, J. H., Bushana, P. N., Todd, R. P., Clegern, W. C., Sorg, B. A., and Wisor, J. P. (2019). Sleep Disruption Elevates Oxidative Stress in Parvalbumin-Positive Cells of the Rat Cerebral Cortex. *Sleep* 42, 1–31. doi:10.1093/sleep/zsy201
- Härtig, W., Mages, B., Aleithe, S., Nitzsche, B., Altmann, S., Barthel, H., et al. (2017). Damaged Neocortical Perineuronal Nets Due to Experimental Focal Cerebral Ischemia in Mice, Rats and Sheep. *Front. Integr. Neurosci.* 11, 15. doi:10.3389/fnint.2017.00015
- Hashemi, E., Ariza, J., Rogers, H., Noctor, S. C., and Martínez-Cerdeño, V. (2018). The Number of Parvalbumin-Expressing Interneurons Is Decreased in the Prefrontal Cortex in Autism. *Cereb. Cortex* 28, 690. doi:10.1093/cercor/bhx063
- Herrera-Molina, R., Mlinac-Jerkovic, K., Ilic, K., Stöber, F., Vemula, S. K., Sandoval, M., et al. (2017). Neuroplastin Deletion in Glutamatergic Neurons Impairs Selective Brain Functions and Calcium Regulation: Implication for Cognitive Deterioration. *Sci. Rep.* 7, 7273. doi:10.1038/s41598-017-07839-9
- Hristova, M., Cuthill, D., Zbarsky, V., Acosta-Saltos, A., Wallace, A., Blight, K., et al. (2010). Activation and Deactivation of Periventricular white Matter Phagocytes during Postnatal Mouse Development. *Glia* 58, 11–28. doi:10.1002/glia.20896
- Huang, Y., Lai, H., Xu, H., Wu, W., Lai, X., Ho, G., et al. (2013). Impact of Perinatal Systemic Hypoxic-Ischemic Injury on the Brain of Male Offspring Rats: An Improved Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in Early Preterm Newborns. *PLoS One* 8, e82502. doi:10.1371/journal.pone.0082502
- Iuvone, L., Geloso, M. C., and Dell'Anna, E. (1996). Changes in Open Field Behavior, Spatial Memory, and Hippocampal Parvalbumin Immunoreactivity Following Enrichment in Rats Exposed to Neonatal Anoxia. *Exp. Neurol.* 139, 25–33. doi:10.1006/exnr.1996.0077
- Johnson, S., and Marlow, N. (2011). Preterm Birth and Childhood Psychiatric Disorders. *Pediatr. Res.* 69, 11R–18R. doi:10.1203/PDR.0b013e318212faa0
- Johnson, T. S. (2011). Healthy Birth Outcomes. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs.* 40, 84–85. doi:10.1111/j.1552-6909.2010.01200.x
- Jovanov Milošević, N., Judaš, M., Aronica, E., and Kostovic, I. (2014). Neural ECM in Laminar Organization and Connectivity Development in Healthy and Diseased Human Brain. *Prog. Brain Res.* 214, 159–178. doi:10.1016/B978-0-444-63486-3.00007-4
- Kaur, C., Sivakumar, V., Ang, L. S., and Sundaresan, A. (2006). Hypoxic Damage to the Periventricular white Matter in Neonatal Brain: Role of Vascular Endothelial Growth Factor, Nitric Oxide and Excitotoxicity. *J. Neurochem.* 98, 1200–1216. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03964.x
- Kelly, C. E., Cheong, J. L. Y., Gabra Fam, L., Leemans, A., Seal, M. L., Doyle, L. W., et al. (2016). Moderate and Late Preterm Infants Exhibit Widespread Brain white Matter Microstructure Alterations at Term-Equivalent Age Relative to Term-Born Controls. *Brain Imaging Behav.* 10, 41–49. doi:10.1007/s11682-015-9361-0
- Kostović, I., Kostović, I., Srzentić, M., Benjak, V., Jovanov-Milošević, N. A., and Radoš, M. (2014b). Developmental Dynamics of Radial Vulnerability in the Cerebral Compartments in Preterm Infants and Neonates. *Front. Neurol.* 5 (JUL), 1–13. doi:10.3389/fneur.2014.00139
- Kostović, I., Jovanov-Milošević, N., Radoš, M., Sedmak, G., Benjak, V., Kostović-Srzentić, M., et al. (2014a). Perinatal and Early Postnatal Reorganization of the Subplate and Related Cellular Compartments in the Human Cerebral Wall as Revealed by Histological and MRI Approaches. *Brain Struct. Funct.* 219, 231–253. doi:10.1007/s00429-012-0496-0
- Kraut, J. A., and Madias, N. E. (2014). Lactic Acidosis. *N. Engl. J. Med.* 371, 2309–2319. doi:10.1056/NEJMr1309483
- Laptook, A. R. (2016). Birth Asphyxia and Hypoxic-Ischemic Brain Injury in the Preterm Infant. *Clin. Perinatology* 43, 529–545. doi:10.1016/j.clp.2016.04.010
- Liu, X.-B., Shen, Y., Plane, J. M., and Deng, W. (2013). Vulnerability of Premyelinating Oligodendrocytes to white-matter Damage in Neonatal Brain Injury. *Neurosci. Bull.* 29, 229–238. doi:10.1007/s122013-1311-5
- Lukoyanova, N., and Lukoyanova, E. (2006). Retrosplenial Cortex Lesions Impair Acquisition of Active Avoidance while Sparing Fear-Based Emotional Memory. *Behav. Brain Res.* 173, 229–236. doi:10.1016/j.bbr.2006.06.026
- McQuillen, P. S., Sheldon, R. A., Shatz, C. J., and Ferriero, D. M. (2003). Selective Vulnerability of Subplate Neurons after Early Neonatal Hypoxia-Ischemia. *J. Neurosci.* 23, 3308–3315. doi:10.1523/jneurosci.23-08-03308.2003
- Mikati, M. A., Zeinieh, M. P., Kurdi, R. M., Harb, S. A., El Hokayem, J. A., Daderian, R. H., et al. (2005). Long-term Effects of Acute and of Chronic Hypoxia on Behavior and on Hippocampal Histology in the Developing Brain. *Develop. Brain Res.* 157, 98–102. doi:10.1016/j.devbrainres.2005.03.007
- Millar, L. J., Shi, L., Hoerder-Suabedissen, A., and Molnár, Z. (2017). Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. *Front. Cel. Neurosci.* 11, 1–36. doi:10.3389/fncel.2017.00078
- Milos, R.-I., Jovanov-Milošević, N., Mitter, C., Bobić-Rasonja, M., Pogledic, I., Gruber, G. M., et al. (2020). Developmental Dynamics of the Periventricular Parietal Crossroads of Growing Cortical Pathways in the Fetal Brain - *In Vivo* Fetal MRI with Histological Correlation. *Neuroimage* 210, 116553. doi:10.1016/j.neuroimage.2020.116553
- Molnár, Z., Luhmann, H. J., and Kanold, P. O. (2020). Transient Cortical Circuits Match Spontaneous and Sensory-Driven Activity during Development. *Science* 370, eabb2153. doi:10.1126/science.abb2153
- Nalivaeva, N. N., Turner, A. J., and Zhuravin, I. A. (2018). Role of Prenatal Hypoxia in Brain Development, Cognitive Functions, and Neurodegeneration. *Front. Neurosci.* 12, 825. doi:10.3389/fnins.2018.00825
- Paxinos, G., and Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates 6th Edition*. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press. Available at: <https://www.elsevier.com/books/the-rat-brain-in-stereotaxic-coordinates/paxinos/978-0-12-374121-9>.
- Pellerin, L., and Magistretti, P. J. (2012). Sweet Sixteen for ANLS. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1152–1166. doi:10.1038/jcbfm.2011.149
- Phifer, C. B., and Terry, L. M. (1986). Use of Hypothermia for General Anesthesia in Prewanling Rodents. *Physiol. Behav.* 38, 887–890. doi:10.1016/0031-9384(86)90058-2
- Quairiaux, C., Sizonenko, S. V., Megevand, P., Michel, C. M., and Kiss, J. Z. (2010). Functional Deficit and Recovery of Developing Sensorimotor Networks Following Neonatal Hypoxic-Ischemic Injury in the Rat. *Cereb. Cortex* 20, 2080–2091. doi:10.1093/cercor/bhp281
- Radenovic, L., Nenadic, M., Ułamek-Kozioł, M., Januszewski, S., Czuczwar, S. J., Andjus, P. R., et al. (2020). Heterogeneity in Brain Distribution of Activated Microglia and



- Astrocytes in a Rat Ischemic Model of Alzheimer's Disease after 2 Years of Survival. *Aging* 12, 12251–12267. doi:10.18632/aging.103411
- Raveendran, A. T., and Skaria, P. C. (2012). Learning and Cognitive Deficits in Hypoxic Neonatal Rats Intensified by BAX Mediated Apoptosis: Protective Role of Glucose, Oxygen, and Epinephrine. *Int. J. Neurosci.* 123, 80–88. doi:10.3109/00207454.2012.731457
- Rice, J. E., Vannucci, R. C., and Brierley, J. B. (1981). The Influence of Immaturity on Hypoxic-Ischemic Brain Damage in the Rat. *Ann. Neurol.* 9, 131–141. doi:10.1002/ana.410090206
- Roumes, H., Dumont, U., Sanchez, S., Mazuel, L., Blanc, J., Raffard, G., et al. (2021). Neuroprotective Role of Lactate in Rat Neonatal Hypoxia-Ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 41, 342–358. doi:10.1177/0271678X20908355
- Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., and Hjerling-Leffler, J. (2011). Three Groups of Interneurons Account for Nearly 100% of Neocortical GABAergic Neurons. *Dev. Neurobiol.* 71, 45–61. doi:10.1002/dneu.20853
- Sekeljic, V., Bataveljic, D., Stamenkovic, S., Ułamek, M., Jabłoński, M., Radenovic, L., et al. (2012). Cellular Markers of Neuroinflammation and Neurogenesis after Ischemic Brain Injury in the Long-Term Survival Rat Model. *Brain Struct. Funct.* 217, 411–420. doi:10.1007/s00429-011-0336-7
- Semenza, G. L. (2000). Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1: Mechanisms and Consequences. *Biochem. Pharmacol.* 59, 47–53. doi:10.1016/S0006-2952(99)00292-0
- Simple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., and Noble-Haueslein, L. J. (2013). Brain Development in Rodents and Humans: Identifying Benchmarks of Maturation and Vulnerability to Injury across Species. *Prog. Neurobiol.* 106–107, 1–16. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.04.001
- Sheikh, A., Meng, X., Liu, J., Mikhailova, A., Kao, J. P. Y., Mcquillen, P. S., et al. (2019). Neonatal Hypoxia-Ischemia Causes Functional Circuit Changes in Subplate Neurons. *Cereb. Cortex* 29, 765–776. doi:10.1093/cercor/bhx358
- Shen, H. H. (2018). Core Concept: Perineuronal Nets Gain Prominence for Their Role in Learning, Memory, and Plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 9813–9815. doi:10.1073/pnas.1815273115
- Shi, W., Wei, X., Wang, X., Du, S., Liu, W., Song, J., et al. (2019). Perineuronal Nets Protect Long-Term Memory by Limiting Activity-dependent Inhibition from Parvalbumin Interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116, 27063–27073. doi:10.1073/pnas.1902680116
- Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, J. E., Sekino, Y., and Sato, K. (2014). Microglia Enhance Neurogenesis and Oligodendrogenesis in the Early Postnatal Subventricular Zone. *J. Neurosci.* 34, 2231–2243. doi:10.1523/JNEUROSCI.1619-13.2014
- Shimomura, C., and Ohta, H. (1988). Behavioral Abnormalities and Seizure Susceptibility in Rat after Neonatal Anoxia. *Brain Develop.* 10, 160–163. doi:10.1016/S0387-7604(88)80020-2
- Slaker, M. L., Jorgensen, E. T., Hegarty, D. M., Liu, X., Kong, Y., Zhang, F., et al. (2018). Cocaine Exposure Modulates Perineuronal Nets and Synaptic Excitability of Fast-Spiking Interneurons in the Medial Prefrontal Cortex. *Eneuro* 5, 0221. doi:10.1523/ENEURO.0221-18.2018
- Sorg, B. A., Berretta, S., Blacktop, J. M., Fawcett, J. W., Kitagawa, H., Kwok, J. C. F., et al. (2016). Casting a Wide Net: Role of Perineuronal Nets in Neural Plasticity. *J. Neurosci.* 36, 11459–11468. doi:10.1523/JNEUROSCI.2351-16.2016
- Stolp, H. B., Fleiss, B., Arai, Y., Supramaniam, V., Vontell, R., Birtles, S., et al. (2019). Interneuron Development Is Disrupted in Preterm Brains with Diffuse White Matter Injury: Observations in Mouse and Human. *Front. Physiol.* 10, 955. doi:10.3389/fphys.2019.00955
- Sukhanova, I. A., Sebestova, E. A., Khukhareva, D. D., Manchenko, D. M., Glazova, N. Y., Vishnyakova, P. A., et al. (2018). Gender-dependent Changes in Physical Development, BDNF Content and GSH Redox System in a Model of Acute Neonatal Hypoxia in Rats. *Behav. Brain Res.* 350, 87–98. doi:10.1016/j.bbr.2018.05.008
- Suttks, A., Rohn, S., Weigel, S., Glöckner, P., Arendt, T., and Morawski, M. (2014). Aggrecan, Link Protein and Tenascin-R Are Essential Components of the Perineuronal Net to Protect Neurons against Iron-Induced Oxidative Stress. *Cell Death Dis* 5, e1119. doi:10.1038/cddis.2014.25
- Takada, S. H., dos Santos Haemmerle, C. A., Motta-Teixeira, L. C., Machado-Nils, A. V., Lee, V. Y., Takase, L. F., et al. (2015). Neonatal Anoxia in Rats: Hippocampal Cellular and Subcellular Changes Related to Cell Death and Spatial Memory. *Neuroscience* 284, 247–259. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.08.054
- Ueno, H., Suemitsu, S., Murakami, S., Kitamura, N., Wani, K., Okamoto, M., et al. (2017a). Region-specific Impairments in Parvalbumin Interneurons in Social Isolation-Reared Mice. *Neuroscience* 359, 196–208. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.07.016
- Ueno, H., Suemitsu, S., Okamoto, M., Matsumoto, Y., and Ishihara, T. (2017b). Parvalbumin Neurons and Perineuronal Nets in the Mouse Prefrontal Cortex. *Neuroscience* 343, 115–127. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.11.035
- Ueno, H., Takao, K., Suemitsu, S., Murakami, S., Kitamura, N., Wani, K., et al. (2018). Age-dependent and Region-specific Alteration of Parvalbumin Neurons and Perineuronal Nets in the Mouse Cerebral Cortex. *Neurochem. Int.* 112, 59–70. doi:10.1016/j.neuint.2017.11.001
- Vanes, L. D., Hadaya, L., Kanel, D., Falconer, S., Ball, G., Batalle, D., et al. (2021). Associations between Neonatal Brain Structure, the Home Environment, and Childhood Outcomes Following Very Preterm Birth. *Biol. Psychiatry Glob. Open Sci.* 1, 146–155. doi:10.1016/j.bpsgos.2021.05.002
- Vann, S. D., and Aggleton, J. P. (2005). Selective Dysgranular Retrosplenial Cortex Lesions in Rats Disrupt Allocentric Performance of the Radial-Arm Maze Task. *Behav. Neurosci.* 119, 1682–1686. doi:10.1037/0735-7044.119.6.1682
- Vannucci, R. C., Connor, J. R., Mauger, D. T., Palmer, C., Smith, M. B., Towfighi, J., et al. (1999). Rat Model of Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage. *J. Neurosci. Res.* 55, 158–163. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19990115)55:2<158::AID-JNR3>3.0.CO;2-1
- Van't Spijker, H. M., Rowlands, D., Rossier, J., Haenzi, B., Fawcett, J. W., and Kwok, J. C. F. (2019/2021). Neuronal Pentraxin 2 Binds PNNs and Enhances PNN Formation. *Neural Plasticity* 2019, 1–13. doi:10.1155/2019/6804575
- Vogt, B. A., and Paxinos, G. (2014). Cytoarchitecture of Mouse and Rat Cingulate Cortex with Human Homologies. *Brain Struct. Funct.* 219, 185–192. doi:10.1007/s00429-012-0493-3
- Vogt, D., Cho, K. K. A., Shelton, S. M., Paul, A., Huang, Z. J., Sohal, V. S., et al. (2018). Mouse Cntnap2 and Human CNTNAP2ASD Alleles Cell Autonomously Regulate PV+ Cortical Interneurons. *Cereb. Cortex* 28, 3868–3879. doi:10.1093/cercor/bhx248
- Vohr, B. R. (2014). Neurodevelopmental Outcomes of Extremely Preterm Infants. *Clin. Perinatology* 41, 241–255. doi:10.1016/j.clp.2013.09.003
- Volpe, J. J. (2012). Neonatal Encephalopathy: An Inadequate Term for Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Ann. Neurol.* 72, 156–166. doi:10.1002/ana.23647
- Wang, D., and Fawcett, J. (2012). The Perineuronal Net and the Control of CNS Plasticity. *Cell Tissue Res* 349, 147–160. doi:10.1007/s00441-012-1375-y
- Wang, X., Karlsson, J. O., Zhu, C., Bahr, B. A., Hagberg, H., and Blomgren, K. (2001). Caspase-3 Activation after Neonatal Rat Cerebral Hypoxia-Ischemia. *Neonatology* 79, 172–179. doi:10.1159/000047087
- Wen, T. H., Binder, D. K., Ethell, I. M., and Razak, K. A. (2018). The Perineuronal 'Safety' Net? Perineuronal Net Abnormalities in Neurological Disorders. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 270. doi:10.3389/fnmol.2018.00270
- Yang, S., Kwok, J. C. F., and Fawcett, J. W. (2014). Neural ECM in Regeneration and Rehabilitation. *Prog. Brain Res.* 214, 179–192. doi:10.1016/B978-0-444-63486-3.00008-6
- Zhang, Q., Ding, Y., Yao, Y., Yu, Y., Yang, L., and Cui, H. (2013). Creating Rat Model for Hypoxic Brain Damage in Neonates by Oxygen Deprivation. *PLoS One* 8, e83589. doi:10.1371/journal.pone.0083589

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Trnski, Nikolić, Ilic, Drlje, Bobic-Rasonja, Darmopil, Petanjek, Hranilovic and Jovanov-Milosevic. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



## GLOSSARY

- ACC** anterior cingulate cortex (area)
- A-B** acid-base status
- BE, ecf** base excess in the extracellular fluid
- Cas 3** cleaved caspase-3
- CC** the number of correct choices in T-maze test
- CD68** class D scavenger receptor 68
- CG** cingulate gyrus
- Cox 4-1** cytochrome-c-oxidase subunit-4 isoform-1
- DAPI** 4',6-diamidino-2-phenylindole; a blue-fluorescent DNA stain
- ECM** extracellular matrix
- F** female
- HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>** bicarbonate
- HI** hypoxic-ischemic
- Hif-1 $\alpha$**  hypoxia-inducible factor-1-alpha
- Iba-1** ionized-calcium-binding-adaptor-molecule-1
- IF** immunofluorescence
- IHC** immunohistochemistry
- M** male
- MCC** mid-cingulate cortex (area)
- Parv** parvalbumin
- p<sup>ATM</sup>** atmosphere pressure
- PBS** phosphate-buffered saline
- FA** formaldehyde
- pH** hydrogen potential
- PNN** perineuronal nets
- PV** parvalbumin-expressing interneurons
- P** postnatal day
- R** number of rearings
- RSC** retro-splenial cortex (area)
- RT** room temperature
- SEM** mean  $\pm$  standard error of the mean
- SVZ** subventricular zone
- TDC** total distance covered in cm
- THV** total number of holes visited
- TO** time spent exploring an inanimate object
- TR** time spent exploring a conspecific
- WB** Western blot method
- Wfa** Wisteria floribunda agglutinin
- % IN** the percentage of the inner holes visited