

Utjecaj šećerne bolesti na razvoj edema i odgovor mikroglije u mišjem modelu ishemije mozga i mrežnice promjenom izražaja bradikininskih receptora

Barić, Anja

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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:105:222493>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Anja Barić

**Utjecaj šećerne bolesti na razvoj edema
i odgovor mikroglije u mišjem modelu
ishemije mozga i mrežnice promjenom
izražaja bradikininskih receptora**

DISERTACIJA



Zagreb, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Anja Barić

**Utjecaj šećerne bolesti na razvoj edema
i odgovor mikroglije u mišjem modelu
ishemije mozga i mrežnice promjenom
izražaja bradikininskih receptora**

DISERTACIJA

Zagreb, 2023.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za regenerativnu neuroznanost, Laboratoriju za neurogenetiku i razvojnu genetiku i Laboratoriju za neurovaskularne poremećaje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet te na Zavodu za histologiju i embriologiju, Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet uz podršku projekata Hrvatske zaklade za znanost „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ (DOK-01-2018) financiranom od strane Operativnog programa „Učinkoviti ljudski potencijali“ 2014-2020 te uspostavnog projekta „Uloga bradikinina u ishemiji mozga i mrežnice u mišjim modelima dijabetesa“ (UIP-2017-05-8082) pod vodstvom Izv. prof. dr. sc. Marine Radmilović.

Voditelj rada: Izv. prof. dr. sc. Marina Radmilović

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Marini Radmilović na svom vremenu, znanju, iskustvu i savjetima koje je nesebično dijelila sa mnom tijekom izrade ovoga rada. Hvala vam što ste u meni uvijek poticali kreativnost, ali i kritičnost, što ste me naučili kako razmišljati izvan okvira, te povrh svega, što ste od samog početka imali nepokolebljivu vjeru u moje sposobnosti i moju budućnost u znanosti.

Iz sveg srca se zahvaljujem Heleni Justić, svojoj drugoj polovici, što mi je uvijek bila najveći oslonac i s kojom sam tijekom ovih godina izgradila prijateljstvo koje ću cijeliti do kraja života.

Zahvaljujem se svim članovima grupe i kolegama na savjetima i pomoći tijekom izrade ovog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji na vječnoj podršci i ljubavi, te ponosu koji gajite za sva moja postignuća.

I na kraju, hvala mojim najbližim i uvijek vjernim prijateljima Lauri, Anji, Andrei, Martini i Borni.

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1. Razvoj šećerne bolesti i dijabetičkih vaskularnih komplikacija	1
1.2. Ishemija mozga i mrežnice	2
1.2.1. Ishemijska kaskada	4
1.2.2. Postishemijski upalni odgovor	5
1.2.3. Razvoj edema	5
1.2.4. Odgovor mikroglije	7
1.2.5. Utjecaj šećerne bolesti na razvoj ishemijske ozljede	11
1.3. Bradikininski signalni put	12
1.3.1. Sinteza i metabolizam bradikinina	12
1.3.2. Aktivacija bradikininskog signalnog puta	14
1.3.3. Distribucija kallikrein-kininskog sustava i bradikininskih receptora unutar mozga i mrežnice	16
1.3.4. Uloga bradikinina i njegovih receptora u razvoju edema nakon ishemijske ozljede mozga i mrežnice	17
1.3.5. Uloga bradikinina i njegovih receptora u odgovoru mikroglije na ishemijsku ozljedu mozga i mrežnice	18
1.3.6. Utjecaj šećerne bolesti na bradikininski signalni put	20
2. HIPOTEZA	22
3. CILJEVI RADA	23
3.1. Opći cilj	23
3.2. Specifični ciljevi	23
4. MATERIJALI I METODE	24
4.1. Pokusne životinje	24

4.2. Genotipizacija miševa	25
4.2.1. Izolacija DNA iz vrška repa miša	25
4.2.2. Umnažanje DNA metodom lančane reakcije polimerazom (PCR)	25
4.2.3. Razdvajanje produkata PCR reakcije elektroforezom	26
4.3. Potvrda šećerne bolesti i određivanje glikemijskog statusa miševa	27
4.4. Neinvazivno mjerenje krvnog i intraokularnog tlaka na anesteziranim miševima	28
4.5. Izazivanje ishemijskog oštećenja mozga i mrežnice	29
4.6. <i>In vivo</i> praćenje razvoja ishemijske ozljede mišjeg mozga i mrežnice	31
4.6.1. Procjena neurološkog oštećenja	31
4.6.2. Fotografija i fluoresceinska angiografija očne pozadine i analiza slika	34
4.6.3. Snimanje mozga i ipsilateralnog oka magnetskom rezonancijom i analiza slika	36
4.6.3.1. Volumetrijska analiza mozga miša	39
4.6.3.2. Analiza MR angiograma	39
4.6.3.3. Volumetrijska analiza mrežnice	40
4.7. Određivanje izražaja bradikininskih receptora u mišjem mozgu i stanicama mikroglije mozga i mrežnice prije i nakon izazivanja ishemije	40
4.7.1. Perfuzijska fiksacija, izolacija i priprema tkiva za imunohistokemijsku analizu	40
4.7.2. Imunohistokemijsko obilježavanje fluorescentnim protutijelima	41
4.7.3. Snimanje imunohistokemijski obilježenog tkiva konfokalnim mikroskopom i analiza slika	43
4.8. Automatska analiza brojnosti i aktivacije stanica mikroglije prije i nakon izazivanja ishemijskog oštećenja mozga	44
4.9. Određivanje genskog izražaja bradikininskih receptora u mišjem mozgu i mrežnici prije i nakon ishemije	46
4.9.1. Žrtvovanje životinja i priprema tkiva za izolaciju ukupne RNA	46

4.9.2. Izolacija ukupne RNA iz mišjeg mozga i mrežnice	47
4.9.3. Sinteza cDNA iz ukupne RNA mišjeg mozga i mrežnice reverznom transkripcijom	48
4.9.4. Određivanje relativnog izražaja mRNA bradikininskih receptora u mišjem mozgu i mrežnicama nakon ishemije kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom (qPCR)	49
4.10. Statistička analiza podataka	50
5. REZULTATI	52
5.1. Određivanje mišjeg genotipa	52
5.2. Šećerna bolest i nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 utječu na glikemijski status i tjelesnu masu	52
5.3. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 ne utječe na krvni tlak	55
5.4. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 sprječava razvoj povišenog intraokularnog tlaka kod dijabetičnih životinja	57
5.5. Šećerna bolest i nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 nemaju značajan utjecaj na preživljenje u akutnoj fazi ishemije	57
5.6. Tijekom MCAO zahvata dolazi do okluzije distalnog dijela srednje moždane arterije nakon koje slijedi nepotpuna reperfuzija	57
5.7. MCAO zahvat dovodi do hipoperfuzije arterijske vaskulature ipsilateralne polutke u akutnoj fazi ishemije	58
5.8. Šećerna bolest i nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 nemaju značajan utjecaj na veličinu ishemijske lezije mozga nakon MCAO zahvata	60
5.9. Promjena volumena moždanih polutki u akutnoj fazi ishemije izraženija je u šećernoj bolesti	61

5.10. Razvoj edema izraženiji je u šećernoj bolesti	63
5.11. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 poboljšava neurološki status u akutnoj fazi ishemije	65
5.12. Šećerna bolest mijenja genski izražaj bradikininskih receptora u mozgu prije i nakon ishemijske ozljede	67
5.13. Šećerna bolest mijenja proteinski izražaj bradikininskih receptora u mozgu nakon ishemijske ozljede	70
5.14. Stanice mikroglije u mozgu izražavaju oba tipa bradikininskih receptora	72
5.15. Brojnost i aktivacijski profil stanica mikroglije prije i nakon ishemijske ozljede mozga promijenjeni su u šećernoj bolesti i kod nedostatka bradikininskog receptora tipa 2	75
5.15.1. Postishemijski pad broja stanica mikroglije u području lezije kore povećan je u prisutnosti šećerne bolesti, a smanjen u nedostatku bradikininskog receptora tipa 2.....	76
5.15.2. Postishemijski pad broja stanica mikroglije u perilezijskom području kore povećan je u prisutnosti šećerne bolesti, a smanjen u nedostatku bradikininskog receptora tipa 2.....	79
5.15.3. Postishemijski pad broja stanica mikroglije u području lezije strijatuma povećan je u šećernoj bolesti, dok nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 umanjuje gubitak stanica samo u kontralateralnoj moždanoj polutci	82
5.15.4. Postishemijski pad broja stanica mikroglije u perilezijskom području strijatuma povećan je u prisutnosti šećerne bolesti, a smanjen u nedostatku bradikininskog receptora tipa 2	85
5.15.5. U području lezije kore postishemijska promjena morfologije i aktivacija stanica mikroglije izraženija je u šećernoj bolesti i u miševa s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2	88

5.15.6. U perilezijskom području kore nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 ublažava izrazitu postishemijsku promjenu morfologije i aktivaciju stanica mikroglije u šećernoj bolesti	91
5.15.7. U području lezije strijatuma nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 ublažava postishemijsku promjenu u morfologiji i aktivaciju stanica mikroglije dijabetičnih životinja, ali je potiče u kontralateralnoj polutki nedijabetičnih životinja.....	94
5.15.8. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 sprječava izrazitu postishemijsku promjenu morfologije i aktivaciju stanica mikroglije u zrcalnom kontralateralnom području perilezijskog strijatuma dijabetičkih miševa	97
5.16. Utjecaj šećerne bolesti i nedostatka bradikininskog receptora tipa 2 na status očne pozadine nakon MCAO zahvata	99
5.17. Zadebljanje mrežnice uslijed ishemije izraženije je u miševa s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2	103
5.18. Šećerna bolest mijenja genski izražaj bradikininskih receptora u mrežnici prije i nakon ishemijske ozljede	106
5.19. Stanice mikroglije mrežnice izražavaju oba tipa bradikininskih receptora	109
6. RASPRAVA	113
6.1. Bradikininski receptor tipa 2 sudjeluje u metabolizmu glukoze i regulaciji intraokularnog tlaka u miševa sa šećernom bolesti	113
6.2. Šećerna bolest i nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 utječu na moždanu postishemijsku vaskularnu propusnost	116
6.3. Šećerna bolest mijenja genski i proteinski izražaj bradikininskih receptora u mozgu	121

6.4. Šećerna bolest potiče gubitak stanica mikroglije uslijed ishemije mozga, a nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 pospješuje njihovo preživljenje.....	124
6.5. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 u šećernoj bolesti smanjuje postishemijsku aktivaciju stanica mikroglije mozga	127
6.6. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 ima suprotno djelovanje na ishemijsku nekrozu i edem mrežnice u prisutnosti i odsutnosti šećerne bolesti	131
6.7. Šećerna bolest mijenja genski izražaj bradikininskih receptora u mrežnici prije i nakon izazivanja ishemije	134
6.8. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 u šećernoj bolesti smanjuje postishemijsku aktivaciju stanica mikroglije mrežnice	135
6.9. Šećerna bolest mijenja ulogu bradikininskog receptora tipa 2 u postishemijskom upalnom odgovoru mozga i mrežnice	138
7. ZAKLJUČAK	141
8. SAŽETAK	143
9. SUMMARY	144
10. LITERATURA	145
11. BIOGRAFIJA	168

POPIS KRATICA

3D-TOF – trodimenzionalno vrijeme proleta (engl. *three-dimensional time-of-flight*)

ACE – angiotenzin I-konvertirajući enzim (engl. *angiotensin-converting enzyme*)

Akita – miševi s dijabetesom tipa 1 soja C57BL/6-Ins2^{Akita}/J

Akita/B2R-KO – miševi s dijabetesom tipa 1 i s onemogućenim genom za bradikininski receptor tipa 2 soja B6.Cg-Ins2^{Akita}/Bdkrb2^{tm1Jfh/SmiJ}

ANOVA – analiza varijance (engl. *analysis of variance*)

ATP – adenzin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

B1R – bradikininski receptor tipa 1 (engl. *bradykinin receptor B1*)

B2R – bradikininski receptor tipa 2 (engl. *bradykinin receptor B2*)

B2R-KO – miševi s onemogućenim genom za bradikininski receptor tipa 2 soja C57BL/6J/Bdkrb2^{tm1Jfh/SmiJ}

BBB – krvno-moždana barijera (engl. *blood-brain barrier*)

BK – bradikinin (engl. *bradykinin*)

BL – početno stanje (engl. *baseline*)

bp – parovi baza (engl. *base pairs*)

BRB – krvno-mrežnična barijera (engl. *blood-retinal barrier*)

CBF – cerebralni krvotok (engl. *cerebral blood flow*)

CCL2 – kemokinski ligand s C-C motivom 2 (engl. *C-C motif chemokine ligand 2*)

CD – klaster diferencijacije (engl. *cluster of differentiation*), npr. CD11b, CD16, CD206

cDNA – komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (engl. *complementary deoxyribonucleic acid*)

CL - kontralateralno (engl. *contralateral*)

CLH – kontralateralna moždana polutka (engl. *contralateral hemisphere*)

CLR - kontralateralna mrežnica (engl. *contralateral retina*)

COX2 – ciklooksigenaza 2 (engl. *cyclooxygenase 2*)

D1 – prvi dan od okluzije središnje moždane arterije

D3 – treći dan od okluzije središnje moždane arterije

DAMP – molekularni obrasci povezani s oštećenjem tkiva (engl. *damage-associated molecular patterns*)

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

eNOS – endotelna sintaza dušikova oksida (engl. *endothelial nitric oxide synthase*)

G α – α podjedinice G proteina (engl. *G-protein alpha subunits*), npr. G α i, G α s, G α 12/13

HK – kininogen visoke molekulske mase (engl. *high molecular weight kininogen*)

HV – visoki napon (engl. *high voltage*)

i.p. – intraperitonealno

Iba-1 – ionizirana kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1 (engl. *ionized calcium binding adaptor molecule 1*)

IL – interleukin (engl. *interleukin*), npr. IL-1, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-18

ILH – ipsilateralna moždana polutka (engl. *ipsilateral hemisphere*)

ILR – ipsilateralna mrežnica (engl. *ipsilateral retina*)

iNOS – inducibilna sintaza dušikova oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase*)

IP₃ – inozitol-1,4,5-trifosfat (engl. *inositol 1,4,5-trisphosphate*)

IPGTT – intraperitonealni test tolerancije na glukozu (engl. *intraperitoneal glucose tolerance test*)

KD – kalidin (engl. *kallidin*)

KKS – kalikrein-kininski sustav (engl. *kallikrein-kinin system*)

LDS – laserski Dopplerov signal (engl. *laser Doppler signal*)

LK – kininogen niske molekulske mase (engl. *low molecular weight kininogen*)

LPS – lipopolisaharid (engl. *lipopolysaccharide*)

MAPK – proteinske kinaze aktivirane mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinases*)

MCAO – okluzija srednje moždane arterije (engl. *middle cerebral artery occlusion*)

MCP-1 – monocitni kemotaksijski protein 1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*)

MMP – metaloproteinaze matriksa (engl. *matrix metalloproteinases*), npr. MMP-9

MR – magnetska rezonancija

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *messenger ribonucleic acid*)

NF- κ B – jezgrin čimbenik kB (engl. *nuclear factor kB*)

Nrf2 – jezgrin eritroidni čimbenik 2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

ON – vidni živac (engl. *optic nerve*)

PBS – fiziološka otopina s fosfatnim puferom (engl. *phosphate buffered saline*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PFA – otopina paraformaldehida (engl. *paraformaldehyde*)

PK – plazmatski kalikrein (engl. *plasma kallikrein*)

PKC – protein kinaza C (engl. *protein kinase C*)

PLA – fosfolipaza A (engl. *phospholipase A*)

PLC – fosfolipaza C (engl. *phospholipase C*)

PPAR γ – gama receptor aktiviran proliferatorom peroksisoma (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor γ*)

qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimerazom (engl. *quantitative polymerase chain reaction*)

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

ROI – područje od interesa (engl. *region of interest*)

ROS – reaktivni kisikovi radikali (engl. *reactive oxygen species*)

rpm – okretaji u minuti (engl. *rounds per minute*)

STAT – pretvarači signala i aktivatori transkripcije (engl. *signal transducers and activators of transcription*)

T1D – dijabetes tipa 1 (engl. *type 1 diabetes*)

T2D – dijabetes tipa 2 (engl. *type 2 diabetes*)

TAE – Tris-acetat EDTA (engl. *Tris-acetate-EDTA*)

TGF- β – transformirajući čimbenik rasta β (engl. *transforming growth factor β*)

TK – tkivni kalikrein (engl. *tissue kallikrein*)

TNF- α – čimbenik nekroze tumora α (engl. *tumor necrosis factor α*)

tPA – tkivni aktivator plazminogena (engl. *tissue plasminogen activator*)

WT – divlji tip (engl. *wild type*), u ovom istraživanju odnosi se na miševe soja C57BL/6J

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Razvoj šećerne bolesti i dijabetičkih vaskularnih komplikacija

Šećerna bolest je zajednički naziv za skupinu kroničnih metaboličkih poremećaja obilježenih povišenom razinom glukoze u krvi zbog nedovoljne proizvodnje inzulina, rezistencije na djelovanje inzulina ili obaju mehanizama. Bolest može biti uzrokovana genskim mutacijama, iako se u većini slučajeva razvija kao posljedica dugogodišnjih loših životnih navika i štetnih okolišnih čimbenika (1). Sve duži životni vijek u kombinaciji s prehranom bogatom visokokaloričnom prerađenom hranom te sjedilačkim načinom života doveli su do globalnog porasta u prevalenciji šećerne bolesti. Skoro 500 milijuna ljudi odrasle dobi diljem svijeta boluje od šećerne bolesti, a prema trenutnim predviđanjima broj oboljelih bi do 2045. godine mogao narasti za čak 30% (2). Prognozička slika dodatno je pogoršana činjenicom da se šećerna bolest sve češće javlja kod djece i adolescenata (3).

U preko 90% dijagnosticiranih slučajeva šećerne bolesti radi se o dijabetesu tipa 2 (engl. *type 2 diabetes* – T2D), stanju inzulinske rezistencije uzrokovane genskim mutacijama, pretilošću ili manjkom fizičke aktivnosti (4). Zbog smanjenog učinka inzulina, posebice u jetri i skeletnim mišićima, istovremeno dolazi do povećane endogene proizvodnje glukoze te smanjenog unosa i potrošnje glukoze u tkivima (5,6). Rezultirajuća povišena razina glukoze u krvi naziva se hiperglikemijom. U normalnim uvjetima smanjena aktivnost inzulina kompenzira se njegovom povećanom proizvodnjom u β -stanicama Langerhansovih otočića gušterače. Međutim, kronična hiperglikemija kod T2D-a štetno djeluje na β -stanice, koje s vremenom postaju disfunkcionalne te gube sposobnost primjerenog odgovora na povišenu razinu glukoze u krvi (7). U kasnijim fazama bolesti, gubitak funkcionalnih β -stanica može dovesti do hipoinzulinemije koja uz inzulinsku rezistenciju doprinosi razvoju hiperglikemije (7,8).

U ostalih 10% slučajeva uglavnom se radi o dijabetesu tipa 1 (engl. *type 1 diabetes* – T1D) ili gestacijskom dijabetesu koji se javlja tijekom trudnoće (2,9). Dijabetes tipa 1 je poremećaj u kojemu zbog autoimune reakcije posredovane T limfocitima dolazi do postupnog razaranja β -stanica te značajnog pada u proizvodnji inzulina (10). Utjecaj genske predispozicije jači je nego kod T2D-a, zbog čega se T1D javlja puno ranije, najčešće prije punoljetnosti, a u zadnje vrijeme sve češće i tijekom prvih par godina života (11,12). Osobe koje boluju od T1D-a u svom tijelu ne mogu proizvesti dovoljne količine inzulina potrebne za normalnu regulaciju glukoze u krvi, zbog čega doživotno ovise o redovitoj primjeni egzogenog inzulina kako bi

nadomjestili nedostatak endogenog. Osim što sudjeluje u metabolizmu glukoze, inzulin ima važnu ulogu i u metabolizmu lipida (13). Nekontrolirana razina glukoze i slobodnih masnih kiselina u krvi štetno djeluje na okolna tkiva te s vremenom može dovesti do teških vaskularnih komplikacija.

Vaskularne komplikacije šećerne bolesti, prisutne u svim organima, ali od posebno značajnog utjecaja na srce, mozak, oči i bubrege, među glavnim su razlozima visokog socioekonomskog tereta ove bolesti uslijed negativnog učinka na kvalitetu života te povećanja smrtnosti pacijenata (14). Kontinuirana izloženost krvožilnih endotelih stanica hiperglikemiji potiče proizvodnju reaktivnih kisikovih radikala (engl. *reactive oxygen species* – ROS), proupalnih citokina: čimbenika nekroze tumora α (engl. *tumor necrosis factor α* – TNF- α), interleukina (engl. *interleukin* – IL) IL-1 β i IL-6 te adhezijskih molekula: E-selektina, adhezijskih molekula vaskularnih stanica 1 (engl. *vascular cell adhesion molecule 1*) i međustaničnih adhezijskih molekula 1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*), dodatno inhibirajući proizvodnju dušikova oksida (engl. *nitric oxide* – NO), što postupno dovodi do propadanja endotelih stanica, sistemske upale te poremećaja u integritetu i funkciji krvnih žila (15–17). Uz mikrovaskularne promjene u svim tkivima, u većim krvnim žilama endotelna disfunkcija potiče razvoj ateroskleroze, koja otežava krvni protok, a u slučaju rupture aterosklerotskog plaka posljedična lokalna tromboza ili distalna embolizacija mogu dovesti i do potpune opstrukcije krvotoka te akutne ishemije zahvaćenih tkiva (18). Prema kliničkim podacima, već u trenutku dijagnoze šećerne bolesti, vaskularne komplikacije prisutne su u skoro 50% slučajeva, a rizik od razvoja teških i potencijalno smrtonosnih događaja poput ishemijskog moždanog udara 2,5 – 3,1 puta je veći kod osoba koje boluju od šećerne bolesti nego u ostatku populacije (14,19). U istoj je mjeri kod oboljelih od šećerne bolesti povišen i rizik od razvoja akutne ishemije mrežnice (20). Dodatno, osim što povećava rizik od razvoja akutne ishemije, prisutnost šećerne bolesti u navedenim stanjima otežava oporavak i povećava smrtnost (21,22).

1.2. Ishemija mozga i mrežnice

Za održavanje golemih metaboličkih zahtjeva mozga potrebna je neometana opskrba moždanog tkiva svježom arterijskom krvlju bogatom kisikom i glukozom. Ishemijski moždani udar nastupa kada je protok krvi u određenom području iznenada prekinut zbog začepjenja moždanih arterija. S obzirom na to da u mozgu ne postoje zalihe glukoze u obliku glikogena,

pad cerebralnog krvotoka (engl. *cerebral blood flow* – CBF) ispod 10 ml/100 g moždanog tkiva/min uzrokuje nagli odgovor i nekrozu stanica u zahvaćenom području (23). Iako ishemija utječe na sve tipove stanica unutar moždanog parenhima, gubitak živčanih stanica ili neurona ima daleko najvažnije posljedice. Mjesto okluzije najčešće se nalazi unutar vaskularnog područja središnjih moždanih arterija, koje opskrbljuju dijelove primarnog motornog i somatosenzornog korteksa, zbog čega pacijenti nakon ishemijskog moždanog udara često pokazuju simptome hemipareze i hemisenzornog gubitka u području lica, trupa i udova te afaziju (24,25). Opseg gubitka tkiva je glavni prediktor rane smrtnosti od moždanog udara (26). Stanice mogu preživjeti privremeni nedostatak raspoložive energije ako se radi o blažem padu CBF-a i zatim se u potpunosti oporaviti ako se dovoljno brzo uspostavi protok krvi (27). Intravenska ili intraarterijska primjena fibrinolitika poput tkivnog aktivatora plazminogena (engl. *tissue plasminogen activator* – tPA) i kirurško uklanjanje ugruška endovaskularnom trombektomijom trenutno su jedini načini liječenja ishemijskog moždanog udara usmjereni na ranu rekanalizaciju začepljenih moždanih arterija i ranu obnovu perfuzije s ciljem minimizacije oštećenja, očuvanja neurološke funkcije i smanjenja smrtnosti (28–31). Međutim, navedeni zahvati učinkoviti su samo u uskom vremenskom okviru nakon nastupa ishemije, a čak i pravovremeno provedeni mogu u određenim slučajevima pogoršati sekundarnu ozljedu mozga te dovesti do težeg oporavka i lošijeg ishoda za pacijenta (32,33).

S obzirom na to da mrežnica kod ljudi ima dva izvora opskrbe krvlju, ishemija mrežnice može biti potpuna ili djelomična. Potpuna ishemija mrežnice javlja se u slučaju okluzije oftalmičke arterije, budući da je ista ujedno izvorište i središnje mrežnične arterije, čiji ogranci opskrbljuju unutarnje slojeve mrežnice, i stražnjih cilijarnih arterija, koje putem kapilarne mreže žilnice, odnosno koriokapilarisa, opskrbljuju vanjske slojeve mrežnice (34). U praksi, najčešći su slučajevi djelomične ishemije unutarnjih slojeva mrežnice zbog izolirane okluzije središnje mrežnične arterije ili njenih ogranaka (35,36). Iako su metabolički zahtjevi mrežnice veći od onih u mozgu, mrežnica je manje osjetljiva na ishemiju zbog skladišta glukoze u staklovini koja može poslužiti kao privremeni izvor energije i u anaerobnim uvjetima (37,38). Krvne žile mrežnice mogu se lako i neposredno vizualizirati oftalmološkim pregledom te dokumentirati metodama fotografije i fluoresceinske angiografije očne pozadine, što neizmjerljivo olakšava dijagnozu i praćenje ishemije mrežnice. Međutim, ni ova velika prednost u usporedbi s mozgom, gdje je potvrda ishemije moguća isključivo korištenjem radioloških metoda poput oslikavanja magnetskom rezonancijom, nije dovela do razvoja zadovoljavajućih metoda liječenja. Trenutno ni jedna od metoda liječenja akutne ishemije mrežnice, kao što su

poticanje kapilarne reperfuzije snižavanjem intraokularnog tlaka, pokušaj pomaka tromba ili embulusa okularnom masažom, pokušaj razgradnje istoga ubrizgavanjem fibrinolitika poput tPA-a, ili primjena hiperbarične oksigenoterapije nije pokazala značajan utjecaj na oporavak vidne funkcije (35). I u mozgu i u mrežnici uspješna rekanalizacija sama po sebi nije dostatna kako bi se minimizirale posljedice ishemijskog oštećenja. To je zato što ishemija i naknadna reperfuzija pokreću cijeli niz patofizioloških procesa koji, svaki na svoj način, utječu na gubitak stanica tijekom razvoja lezije i reorganizaciju tkiva tokom oporavka. Takozvana ishemijska kaskada u mozgu i mrežnici uključuje skoro identične procese budući da tkiva dijele embrionalno podrijetlo te brojne histološke i fiziološke sličnosti (39). To je 2003. godine potvrdilo i Američko društvo za moždani udar (engl. *American Stroke Association*) koje je definiralo pojam infarkta središnjeg živčanog sustava kao infarkt mozga, kralježnične moždine ili mrežnice (40).

1.2.1. Ishemijska kaskada

U mozgu i mrežnici, nedostatak glukoze i kisika uzrokuje poremećaj metabolizma i ionske ravnoteže, ekscitotoksičnost, oksidativni stres, povećanje propusnosti krvno-moždane barijere (engl. *blood-brain barrier* – BBB) i krvno-mrežnične barijere (engl. *blood-retinal barrier* – BRB), razvoj edema te aktivaciju upalnog odgovora (41). Razumijevanje isprepletene prirode ovih događaja i njihove složene vremenske dinamike ključno je u istraživanju novih terapijskih ciljeva za liječenje ishemijske ozljede mozga i mrežnice.

Glukoza i kisik neophodni su za sintezu adenzin trifosfata (engl. *adenosine triphosphate* – ATP) čijom se razgradnjom oslobađa energija potrebna za održavanje normalne strukture i funkcije stanica, širenje akcijskog potencijala i prijenos signala među živčanim stanicama (42). U području ishemijske lezije deplecijom ATP-a prestaje rad ATP-ovisnih ionskih pumpi poput Na^+/K^+ -ATP-aze što rezultira preraspodjelom iona između stanica i međustaničnog prostora, depolarizacijom stanica i nekontroliranim oslobađanjem neuroprijenosnika u izvanstaničnu tekućinu (43). Za stanice je posebno štetno nakupljanje glutamata, pobuđujućeg neuroprijenosnika koji vezanjem na N-metil-D-aspartatne receptore potiče ulazak iona Ca^{2+} , koji sudjeluju u aktivaciji enzima za razgradnju proteinskih i lipidnih staničnih komponenti (44,45). Osmotski gradijent uzrokovan poremećajem u ravnoteži iona uzrokuje citotoksični edem, odnosno bubrenje stanica zbog priljeva vode iz međustaničnog prostora pasivnom difuzijom kroz kanale za vodu (46). Oštećene stanice pod pritiskom edema

ubrzo gube kontrolu nad integritetom membrane i osnovnim staničnim procesima te podliježu nekrozi otpuštajući pritom sav svoj sadržaj u međustanični prostor (47). U perilezijskom području, krvna opskrba može se djelomično nadomjestiti kolateralnim žilama, ali bez prave reperfuzije većina oštećenih stanica s vremenom ipak umire. Budući da su dostupne bar male količine ATP-a, u perilezijskom području stanična smrt odvija se kontroliranim procesom apoptoze koji je puno manje štetan za okolno tkivo. Razvoj sekundarne ozljede zbog gubitka stanica u perilezijskom području je sporiji, a dodatni gubitci stanica uzrokovani nekontroliranom upalom akumuliraju se i tjednima nakon primarnog infarkta (48).

1.2.2. Postishemijski upalni odgovor

Upala je normalan fiziološki odgovor na ozljedu čiji je primarni cilj što učinkovitije reducirati nastalo oštećenje kako bi se spasilo što je moguće više tkiva. Međutim, nekontrolirana i/ili kronična upala može imati suprotan učinak i djelovati štetno na sam oporavak. U mozgu i mrežnici, postishemijski upalni odgovor pokreće se oslobađanjem medijatora upale, uključujući peptid bradikinin (engl. *bradykinin* – BK), utječući na poremećaj BBB-a/BRB-a i posljedični razvoj edema, koji je popraćen nakupljanjem upalnih stanica, prvo rezidentne mikroglije, a naknadno i perifernih stanica imunskog sustava (49,50).

1.2.3. Razvoj edema

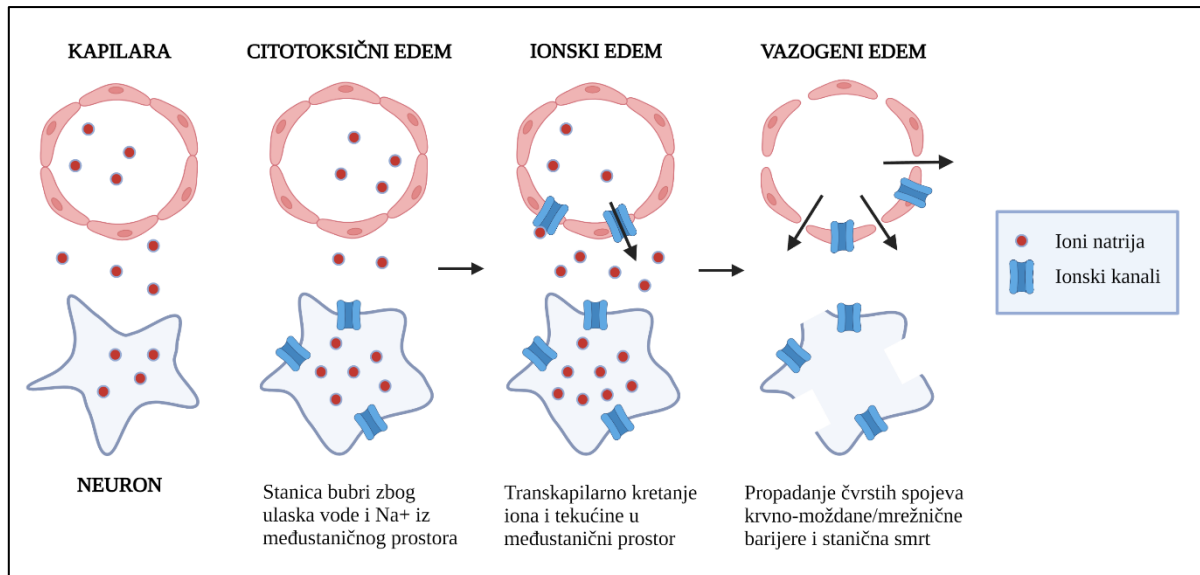
Klinički znakovi razvoja edema jedan su od glavnih prediktora rane smrti nakon ishemijskog moždanog udara. Zbog ograničenog prostora unutar lubanje, oticanje mozga uzrokuje povećanje intrakranijskog tlaka i distorziju tkiva pa tako s većim edemom raste i pritisak na tkivo koji ometa pravilnu reperfuziju te može ubrzati razvoj neurodegenerativnih i neuroloških poremećaja (51,52).

Postoje tri faze razvoja edema; citotoksični, ionski i vazogeni edem (Slika 1). Već u prvim minutama nakon ishemije, zbog disfunkcije o ATP-u ovisnih ionskih transportera i otvaranja ionskih kanala dolazi do nakupljanja Na^+ i Cl^- iona u stanici. Poremećaj ionske ravnoteže remeti osmotski gradijent, zbog čega uz ione u stanicu iz međustaničnog prostora ulazi i voda, što dovodi do bubrenja stanica i razvoja citotoksičnog edema, posebno kod neurona i astrocita (46). Citotoksični edem sam po sebi ne uzrokuje oticanje tkiva jer se stanice šire nauštrb međustaničnog prostora, ali zato potiče stvaranje ionskog i vazogenog edema. Kako bi se nadomjestio manjak iona i tekućine u međustaničnom prostoru uzrokovan razvojem

citotoksičnog edema potiče se transkapilarno kretanje iona i vode iz krvnih žila u tkivo (53). Kako se međustanični prostori ponovno pune, tkivo počinje oticati i razvija se ionski edem. U ovoj fazi prolazak velikih molekula kroz BBB/BRB još je uvijek pod kontrolom specijaliziranih ulaznih i izlaznih proteinskih transportera koji strogo reguliraju izmjenu tvari između krvi i mozga ili mrežnice (54). Endotelne stanice kapilara središnjeg živčanog sustava međusobno su povezane čvrstim spojevima i okružene prvo bazalnom membranom, a potom i izdancima astrocita i pericita, tako da je paracelularni transport u potpunosti blokiran (55,56). Poremećajem BBB-a/BRB-a ionski edem prelazi u vazogeni. Vrhunac vazogenog edema kod glodavaca doseže se 2 – 3 dana, a kod ljudi 3 – 5 dana nakon ishemije, nakon čega slijedi postupna rezolucija (67-70). Propadanje čvrstih spojeva, kontrakcija i apoptoza endotelne stanice, razgradnja bazalne membrane te odvajanje pericita i astrocita od endotelne stanice glavni su uzroci narušenog integriteta BBB-a/BRB-a (57–59). U pozadini ovih procesa leži rastuća koncentracija proupalnih citokina i drugih medijatora upale u akutnoj fazi nakon ishemije, posebice vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*), kemokinskog liganda s C-C motivom 2 (engl. *C-C Motif Chemokine Ligand 2 – CCL2*), TNF- α , IL-6 i BK-a, koji potiču fosforilaciju i translokaciju proteina čvrstih spojeva, povećanu proizvodnju ROS-a te izlučivanje i aktivaciju metaloproteinaza matriksa (engl. *matrix metalloproteinase – MMP*), koje razgrađuju međustaničnu tvar (60–64). Kroz propusnu BBB/BRB sada više ne prolaze samo ioni i voda već i proteini seruma i druge veće molekule koje dodatno narušavaju osmotski gradijent.

Povećana propusnost BBB-a/BRB-a i širenje međustaničnih prostora zbog priljeva tekućine omogućuju infiltraciju, migraciju i nakupljanje perifernih i rezidentnih stanica imunskog sustava na oštećenom području (65). Na oštećenje uzrokovano ishemijom prve reagiraju rezidentne stanice mikroglije, a u stopu ih prate periferni neutrofili, monociti, B i T limfociti te dendritičke stanice (49,66). Na svom putu one oslobađaju proupalne citokine i kemokine kako bi privukle i aktivirale što veći broj imunskih stanica, iako time istovremeno doprinose razvoju sekundarne ishemijske ozljede zbog dodatne destabilizacije BBB-a/BRB-a i poticanja apoptoze kod oštećenih neurona (65). Postupna rezolucija edema i upale te obnova i stabilizacija BBB-a/BRB-a ovisi o fagocitozi viška upalnih stanica i otpuštanju protoupalnih citokina IL-10 i transformirajućeg čimbenika rasta β (engl. *transforming growth factor β – TGF- β*), koji inhibiraju izražaj proupalnih citokina i MMP-a te infiltraciju i daljnju polarizaciju imunskih stanica prema proupalnom fenotipu (67,68). U postishemijskom upalnom odgovoru tkiva središnjeg živčanog sustava glavnu ulogu svakako imaju aktivirane stanice mikroglije,

koje se najduže zadržavaju na mjestu ozljede te su glavni izvor upalnih čimbenika u središnjem živčanom sustavu.



Slika 1. Tri faze razvoja moždanog i mrežničnog edema nakon ishemije. Razvoj edema nakon ishemije započinje poremećajem ionske ravnoteže između stanice i međustaničnog prostora zbog nekontroliranog ulaska iona natrija putem ionskih kanala u stanicu. Preraspodjela iona između unutarstaničnog i izvanstaničnog prostora mijenja osmotski gradijent koji potiče ulazak vode u stanicu, bubrenje stanice i razvoj citotoksičnog edema. Citotoksični edem direktno utječe na razvoj ionskog edema odnosno oticanja tkiva zbog prelaska iona i vode iz hipertoničnog intravaskularnog u hipotoničan međustanični prostor. Ionski edem prelazi u vazogeni edem u trenutku propadanja čvrstih spojeva i destabilizacije krvno-moždane/mrežnične barijere što omogućuje prelazak proteina i drugih većih molekula iz krvi u međustanični prostor. Prilagođeno iz (69). Izrađeno s BioRender.com.

1.2.4. Odgovor mikroglije

Mikroglija je rezidentna populacija multifunkcionalnih mononuklearnih fagocita koji potječu od mijeloidnih progenitorskih stanica žumanjčane vreće, a središnji živčani sustav koloniziraju tijekom ranih razvojnih faza (70). Kao pripadnica imunskog sustava, mikroglija sudjeluje u obrani tkiva od mikroorganizama i oporavku nakon ozljede eliminacijom patogena te oštećenih i apoptotičnih stanica fagocitozom i predvođenjem upalnog odgovora otpuštanjem proupalnih i protuupalnih citokina (71,72). Za mikrogliju se dugo vremena smatralo da su uglavnom neaktivne stanice koje se aktiviraju samo u slučaju infekcije ili ozljede, međutim danas je dobro poznato da mikroglija svojim pokretnim staničnim nastavcima kao sensorima vrši konstantan nadzor svoje okoline, izmjenjuje signale sa susjednim stanicama, uklanja

suviše stanice i potpomaže normalnu funkciju živčanih stanica (73). Unutar zdravih tkiva središnjeg živčanog sustava, imunohistokemijski ili histokemijski obilježena mikroglia može se lako prepoznati po relativno maloj somi i dugačkim razgranatim nastavcima (74). U mozgu, čak ni u uvjetima homeostaze stanice mikroglie nisu u potpunosti uniformne već variraju u broju i morfologiji ovisno o poziciji koju zauzimaju unutar tkiva. Osim radijalno razgranatih stanica koje su najučestalije i nadgledaju najveći postotak moždanog parenhima, uz snopove živčanih vlakana mogu se naći i uzdužno razgranate stanice, a u perivaskularnom prostoru i kompaktne stanice sa svega par kratkih i debelih nastavaka (74). U odraslom mišjem mozgu najviše mikroglie ima u olfaktornim bulbusima, hipokampusu i bazalnim ganglijima, nešto manje u moždanoj kori, talamusu i hipotalamusu, a najslabije su naseljena područja malog mozga i moždanog debla (74). U mrežnici, mikroglia se najčešće nalazi u vanjskom i unutrašnjem mrežastom sloju te sloju ganglijskih stanica (75).

Duž nastavaka stanica mikroglie nalazi se čitav niz receptora čija je uloga prepoznati bakterijske, virusne i gljivične patogene, toksine i ksenobiotike, kao i štetne molekule koje se oslobađaju iz mrtvih ili umirućih stanica tijekom traumatske ozljede, ishemije ili drugih neurodegenerativnih procesa (71). Primjerice, nakon ishemije, oštećene i nekrotične stanice zbog narušene stanične membrane u međustanični prostor oslobađaju citoplazmatske molekule poput ATP-a te B1 proteina grupe visoke mobilnosti (engl. *high mobility group box 1*) i proteina toplinskog šoka (engl. *heat shock proteins*). Izvan stanice, te endogene molekule postaju molekulski obrasci povezani s oštećenjem tkiva (engl. *damage-associated molecular patterns* – DAMP), koji se vežu za receptore za prepoznavanje molekulskih obrazaca na površini mikroglie (76–78). I u mozgu i u mrežnici, mikroglia se nakon detekcije DAMP molekula u svojoj okolini aktivira te pokreće upalni odgovor. Aktivacija je proces u kojemu stanice mikroglie pod utjecajem signala primljenih iz okoline mijenjaju svoju morfologiju i površinske biljege, preuzimaju funkcionalno različite fenotipove te izlučuju niz upalnih posrednika kojima utječu na preživljenje stanica, na integritet BBB-a/BRB-a te na razvoj edema i drugih upalnih procesa (79). Osim DAMP molekula, i drugi upalni čimbenici koji se otpuštaju prilikom ishemije, poput BK-a, također mogu utjecati na aktivaciju mikroglie (80). Prelaskom u viša aktivacijska stanja dolazi do povećanja i promjene oblika tijela stanica mikroglie preko ameboidnog u okrugao, uz istovremeno skraćivanje pa i potpunu resorpciju izdanaka tipičnih za mirujuće stanje (Slika 2) (81,82). Opsežne morfološke promjene odraz su funkcionalnih promjena; razgranati oblik nadzorne mikroglie idealan je za pokrivanje što većeg teritorijalnog volumena u fazi mirovanja, dok ameboidno tijelo bez puno nastavaka

aktiviranoj mikrogliji omogućuje lakše kretanje kroz parenhim prema mjestu ozljede te pospješuje fagocitozu (83). Ishemija u mozgu i mrežnici već u prvim satima na području lezije i okolnog tkiva dovodi do nakupljanja aktiviranih stanica mikroglije koje dosežu svoju najveću brojnost između trećeg i sedmog dana, ovisno o eksperimentalnom modelu, a u mozgu ih se može naći i preko mjesec dana od početnog inzulta (66,78,84,85). Nakupljanje mikroglije na ozlijeđenom području posljedica je proliferacije i migracije mikroglije iz distalnih i nezahvaćenih područja (86,87).

Aktivirana mikroglija može djelovati proupalno i protuupalno te prelaziti iz jednog fenotipa u drugi ovisno o području ishemijske lezije, signalima koje otpuštaju okolne stanice te trajanju ishemije (88). U prvom tjednu nakon ozljede središnjeg živčanog sustava uglavnom prevladava mikroglija protuupalnog fenotipa, koja kao biljeg na površini izražava klaster diferencijacije CD206 (engl. *cluster of differentiation* – CD) (79). Polarizaciju prema protuupalnom fenotipu predvodi aktivacija i nuklearna translokacija transkripcijskih čimbenika gama receptora aktiviranog proliferatorom peroksisoma (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor γ* – PPAR γ) i jezgrinog eritroidnog čimbenika 2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* – Nrf2), koji potiču izražaj neurotrofnih i protuupalnih čimbenika IL-4, IL-10, IL-13 i TGF- β (89,90). Za mikrogliju protuupalnog fenotipa tipičan je vrlo visok izražaj citoplazmatskog enzima arginaze-1, koja potiče fagocitoznu aktivnost te je ista izraženija u usporedbi s mikroglijom proupalnog fenotipa (91). Uklanjanjem staničnih ostataka i viška upalnih stanica fagocitozom te poticanjem obnove međustanične tvari, smanjuje se štetan utjecaj upale na razvoj lezije i apoptozu. Osim toga, IL-4, IL-10 i TGF- β potiču preživljenje neurona, proliferaciju i diferencijaciju progenitorskih stanica u subventrikularnoj zoni, ali i angiogenezu, što smanjuje veličinu lezije i potpomaže oporavak (92). Oko sedmog dana nakon ishemije, mijenja se omjer protuupalne i proupalne mikroglije u korist proupalnog fenotipa, koji prevladava u kroničnoj fazi. Aktivacija transkripcijskih čimbenika poput jezgrinog čimbenika κ B (engl. *nuclear factor κ B* – NF- κ B) te pretvarača signala i aktivatora transkripcije (engl. *signal transducers and activators of transcription*) u proupalnoj mikrogliji potiče izražaj i otpuštanje citokina i kemokina TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18, CCL2 i kemokinskog liganda s C-C motivom 3 (engl. *C-C motif chemokine ligand 3*), koji pojačavaju upalni odgovor i razinu oksidativnog stresa te doprinose degradaciji BBB-a/BRB-a i staničnoj smrti. Citotoksični učinak ovih molekula štetno djeluje na neurogenezu i oporavak (93–95).

Da prisutnost mikroglije direktno utječe na težinu ishemijske ozljede potvrđuju istraživanja u kojima je prije izazivanja ishemije eliminirano i do 90% stanica mikroglije u

mozgu inhibicijom receptora faktora stimulacije kolonija tipa 1 (engl. *colony stimulating factor 1 receptor*), koji je neophodan za njihovo preživljenje. Odsustvo, odnosno deplecija mikroglije tijekom akutne faze eksperimentalnog ishemijskog moždanog udara, kada inače prevladava protuupalni fenotip, dovodi do povećanog volumena lezije, smanjenog broja preživjelih neurona i lošijeg neurološkog statusa, dok repopulacija mikroglije netom prije izazivanja ishemijske lezije poništava učinak prethodne deplecije na veličinu lezije (96–98). Neki od načina na koji aktivirana mikroglija djeluje neuroprotektivno u akutnoj fazi nakon ishemijske lezije mozga su zaštita neurona od preopterećenja Ca^{2+} , regulacija infiltracije perifernih monocita, neutrofila i T limfocita te inhibicija otpuštanja citokina IL-1, TNF-a i IL-6 iz astrocita (96,97,99). Ako je mikroglija prisutna tijekom akutne faze razvoja lezije, ali je inhibirana njena aktivacija i proliferacija, kao što je slučaj kod miševa s onemogućenim genom za upalni medijator galektin-3, također dolazi do značajnog pogoršanja ishemijske ozljede zbog povećanja u veličini ishemijske lezije, udvostručenja broja apoptotičnih neurona i deregulacije razine neuroprotektivnog inzulinu sličnog čimbenika rasta 1 (engl. *insulin-like growth factor 1*) (100). S druge strane, inhibicija aktivacije i polarizacije mikroglije prema proupalnom fenotipu ublažuje upalni odgovor, čuva integritet sive i bijele tvari te dugoročno dovodi do boljeg oporavka neuroloških funkcija nakon eksperimentalnog ishemijskog moždanog udara (101). Ovo ukazuje na dvojakulogu ulogu mikroglije u razvoju ishemijske ozljede, koja je blagotvorna kada prevladava protuupalni, a štetna kada prevladava proupalni fenotip. Međutim, klasifikacija aktivirane mikroglije puno je kompliciranija od podjele na isključivo proupalni i protuupalni tip, budući da postoje i stanice intermedijarnog fenotipa koje izražavaju biljege objaju navedenih (102).



Slika 2. Promjena morfologije stanica mikroglije prilikom aktivacije u upalnim procesima. Prelaskom mikroglije iz mirujućeg u viša aktivacijska stanja dolazi do povlačenja staničnih nastavaka i povećanja volumena tijela stanice, što mikrogliji omogućuje lakšu migraciju do mjesta ozljede i fagocitozu oštećenih stanica, viška upalnih stanica i staničnih ostataka. Prilagođeno iz (103). Izrađeno s BioRender.com.

1.2.5. Utjecaj šećerne bolesti na razvoj ishemijske ozljede

Čak i u slučajevima brze reakcije i uspješne rane reperfuzije, šećerna bolest pogoršava ishemijsku leziju, otežava oporavak te povećava rizik od smrti nakon ishemijskog moždanog udara (104,105). Lošiji ishod ishemijskog moždanog udara kod osoba koje istovremeno boluju od šećerne bolesti posljedica je štetnog učinka već postojeće kronične sistemske upale niskog stupnja, endotelne disfunkcije, dislipidemije, inzulinske rezistencije, hiperglikemije i u mnogim slučajevima hipertenzije u trenutku ishemije (106). Perturbacije u ishemijskoj kaskadi uzrokovane šećernom bolesti rezultiraju većim gubitkom stanica, narušenim integritetom bjele tvari, poremećajem u mijelinizaciji te oslabljenim kapacitetom neuroplastičnosti, koji ultimativno dovode do trajnih funkcionalnih i kognitivnih deficita (104,107,108).

Hiperglikemija usporava obnovu aerobne razgradnje glukoze i proizvodnje ATP-a nakon ponovne uspostave krvne opskrbe na ishemijskom području. Anaerobni metabolizam dovodi do nakupljanja laktata i acidoze tkiva koja je citotoksična za stanice te do povećane mitohondrijske proizvodnje ROS molekula koji imaju niz štetnih učinaka (109). U endotelnim stanicama velike količine ROS molekula inhibiraju proizvodnju NO-a i vazodilataciju što rezultira i do 24% slabijom reperfuzijom kod hiperglikemičnih životinja u eksperimentalnim modelima ishemijskog moždanog udara (110). Hiperglikemija također dodatno potiče otpuštanje glutamata te unos iona Ca^{2+} u stanice, čime promovira razvoj citotoksičnog edema i staničnu smrt (111,112). Prisutnost šećerne bolesti tijekom ishemije mijenja aktivaciju mnogih signalnih puteva, posebice aktivaciju upalnog NF- κ B signalnog puta i transkripciju gena koji su pod njegovom kontrolom (113). Kod dijabetičkih životinja, u akutnoj fazi nakon ishemije, uočene su povišene razine citokina IL-1 β , IL-6 i TNF- α , adhezijskih molekula E-selektina i P-selektina, kemokina monocitnog kemotaksijskog proteina 1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1* - MCP-1) i makrofagnog upalnog proteina 1 α (engl. *macrophage inflammatory protein 1 α*) te upalnih medijatora ciklooksigenaze 2 (engl. *cyclooxygenase 2* - COX2), MMP-9 i inducibilne sintaze dušikova oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase* – iNOS) (113–116). Takav proupalni milje dodatno potiče degradaciju BBB-a, razvoj vazogenog edema te povećava rizik od hemoragijske transformacije u odnosu na postishemijski upalni odgovor u normoglikemijskim uvjetima (117–119). Osim toga, pod utjecajem TNF- α , MCP-1 i adhezijskih molekula dolazi do prolongirane i povećane infiltracije neutrofila, leukocita, T i B limfocita (114,120,121).

Jačem upalnom odgovoru na ishemiju mozga i mrežnice u prisutnosti šećerne bolesti u velikoj mjeri doprinosi izmijenjeni odgovor rezidentne mikroglije. I prije samog nastupa ishemije, hiperglikemija promovira proliferaciju mikroglije i izražaj proupalnih čimbenika CD16, iNOS i TNF- α , što mikrogliju dovodi u predaktivacijsko stanje (122). U predaktivacijskom stanju, stanice mikroglije su osjetljivije i burnije reagiraju na sekundarni upalni podražaj. Istraživanja na različitim modelima eksperimentalnog ishemijskog moždanog udara kod glodavaca pokazala su da šećerna bolest uzrokuje povećanje ukupnog broja aktivirane mikroglije među kojom i u akutnoj fazi prevladava proupalni fenotip, što u konačnici dovodi do većih funkcionalnih i kognitivnih oštećenja (107,123). Pojačanu aktivaciju mikroglije nakon ishemije u prisustvu šećerne bolesti podupire i morfološka analiza mikroglije perilezijskog područja kod dijabetičnih štakora, koja je pokazala veću somu te smanjen broj i ukupnu duljinu staničnih nastavaka u usporedbi s perilezijskom mikroglijom kontrolnih životinja (123). Kod nedijabetičnih životinja, deplecija mikroglije tijekom akutne faze ishemije dovodi do pogoršanja ishemijske ozljede. Međutim, kod dijabetičkih životinja deplecija kronično aktivirane proupalne mikroglije utišava upalu, sprječava demijelinizaciju bijele tvari, poboljšava stanično preživljenje te smanjuje kognitivno oštećenje nakon ishemije mozga (124).

Bolje razumijevanje preciznih staničnih mehanizama koji doprinose pogoršanju upalnog procesa i ishemijske ozljede središnjeg živčanog sustava kod dijabetesa još uvijek je potrebno. Očito je da veliku ulogu igraju medijatori upale, čiji se izražaj mijenja u prisustvu šećerne bolesti, međutim za većinu njih se ne zna kako ta promjena u izražaju mijenja njihovu ulogu u ishemijskoj kaskadi i postishemijskom upalnom odgovoru.

1.3. Bradikininski signalni put

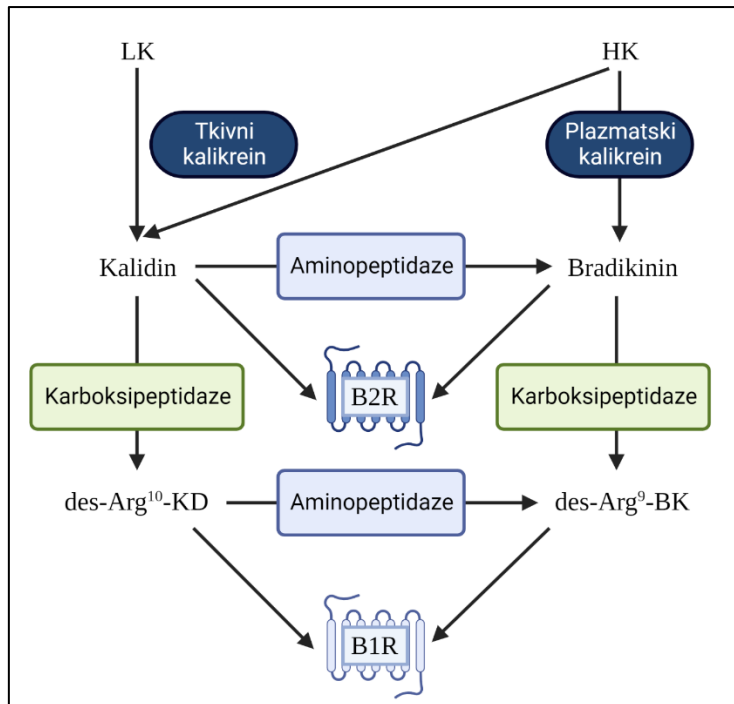
1.3.1. Sinteza i metabolizam bradikinina

Bradikinin, član kalikrein-kininskog sustava (engl. *kallikrein-kinin system* - KKS), među prvim je upalnim čimbenicima koji se oslobađaju s nastupom ishemije (125). Kalikrein-kininski sustav je endogeni sustav aktivnih peptida kinina, njihovih proteinskih prekursora kininogena te skupine serinskih proteaza kalikreina koje sudjeluju u njihovoj sintezi i metabolizmu. Poznat je po svojoj fiziološkoj ulozi u regulaciji krvnog tlaka, boli, zgrušavanja krvi, ravnoteže elektrolita i bubrežnog protoka krvi (151–156). Mnoge od ovih funkcija rezultat su djelovanja BK-a na endotelne stanice što dovodi do vazodilatacije i povećanog protoka krvi

(157). U zadnjih nekoliko godina, sve se više istražuje i uloga BK-a u metabolizmu glukoze, budući da se pokazalo da aktivacija bradikininskog signalnog puta utječe na translokaciju transportera glukoze i unos glukoze u stanice (126). Različite komponente KKS-a aktivno sudjeluju i u razvoju mnogih patoloških poremećaja poput respiratorne alergijske reakcije, bolesti srca, angioedema, dijabetičke nefropatije i retinopatije, ishemijskog moždanog udara i drugih neuroloških poremećaja (144,154,158–160).

Postoje dva ogranka KKS-a koji oslobađaju kinine BK i kalidin (engl. *kallidin* - KD) te njihove metabolite des-Arg⁹-BK i des-Arg¹⁰-KD, od kojih se jedan nalazi u plazmi, a drugi u tkivu (Slika 3) (127). Primarno mjesto sinteze kinina je u tkivima.

Bradikinin je nonapeptid (Arg¹-Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸-Arg⁹, C₅₀H₇₃N₁₅O₁₁) koji nastaje cijepanjem kininogena visoke molekulske mase (engl. *high molecular weight kininogen* – HK) plazmatskim kalikreinom (engl. *plasma kallikrein* - PK) (128,129). Plazmatski kalikrein se sintetizira u jetri, a iz hepatocita se oslobađa u inaktivnom obliku proenzima prekalikreina koji stvara heterodimere s HK-om (130). Za pretvorbu prekalikreina u PK zadužen je faktor koagulacije XII (Hagemanov faktor), koji se prethodno sam aktivira u dodiru s negativnom površinom endotelnih stanica. Aktivni PK oslobađa BK cijepajući HK na dva mjesta (129). Tkivni kalikrein (engl. *tissue kallikrein* - TK), koji je između ostalog prisutan diljem mokraćnog, dišnog, krvožilnog, probavnog i središnjeg živčanog sustava, kod ljudi cijepa kininogen niske molekulske mase (engl. *low molecular weight kininogen* – LK) i HK kako bi oslobodio dekaeptid KD, a u glodavaca može oslobađati i BK (127,131,132). Bradikinin se također oslobađa cijepanjem KD-a aminopeptidazama. Zbog kratkog životnog vijeka od svega 30 s, BK i KD djeluju autokrino i/ili parakrino vežući se za bradikininski receptor tipa 2 (engl. *bradykinin receptor B2* - B2R) (133). Kinini se mogu dalje cijepati karboksipeptidazama u aktivne metabolite poput des-Arg⁹-BK i des-Arg¹⁰-KD, koji se vežu za bradikininski receptor tipa 1 (engl. *bradykinin receptor B1* - B1R), ili neaktivne peptide koji se s vremenom razgrađuju (134). Čak 90% ukupnog BK-a metabolizira angiotenzin I-konvertirajući enzim (engl. *angiotensin-converting enzyme* – ACE), a ostalih 10% se razgrađuje aminopeptidazom P, neutralnom endopeptidazom ili karboksipeptidazama M i N (135). Angiotenzin I-konvertirajući enzim pripada renin-angiotenzinskom sustavu koji, suprotno KKS-u, sudjeluje u vazokonstrikciji i povišenju krvnog tlaka (136). Odcjepljivanjem zadnje 3 ili 4 aminokiseline s C-terminalnog kraja, ACE pretvara BK i des-Arg⁹-BK u neaktivni pentapeptid BK_[1-5] (137).

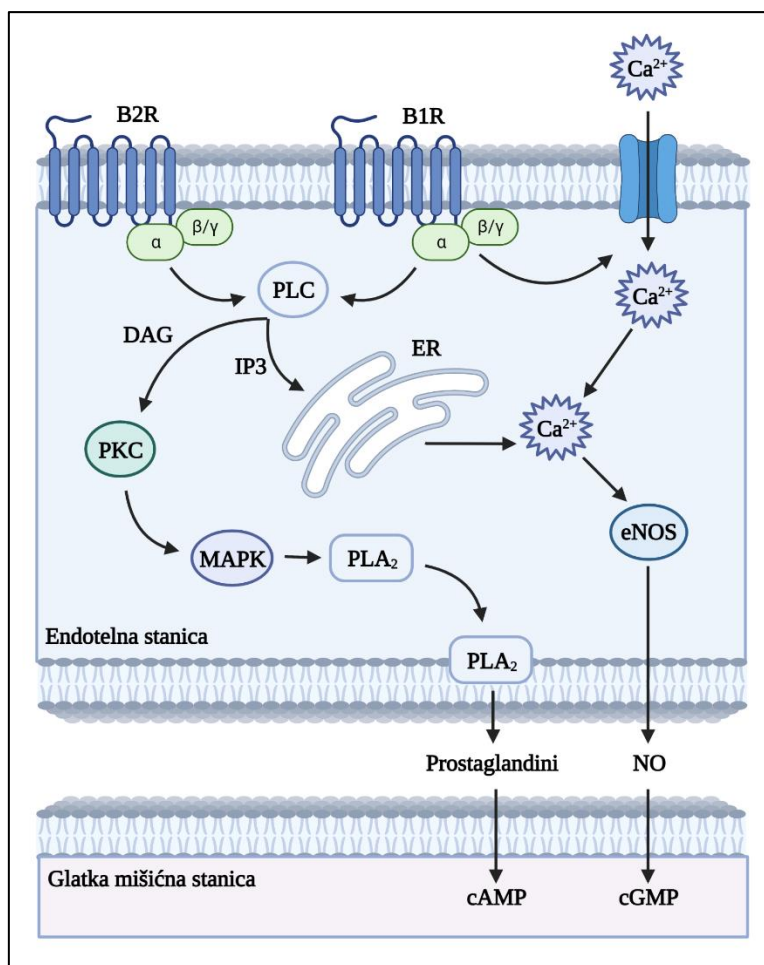


Slika 3. Pregled kalikrein-kininskog sustava. Aktivni peptidi kalidin i bradikinin oslobađaju se iz kininogena niske molekulske mase (LK) i kininogena visoke molekulske mase (HK) djelovanjem tkivnog i plazmatskog kalikreina. Kinini aktiviraju bradikininški receptor tipa 2 (B2R) ili se karboksipeptidazama metaboliziraju u des-Arg¹⁰-KD i des-Arg⁹-BK koji aktiviraju bradikininški receptor tipa 1 (B1R). Aminopeptidaze dodatno oslobađaju bradikinin (BK) iz kalidina (KD) te des-Arg⁹-BK iz des-Arg¹⁰-KD. Prilagođeno iz (132). Izrađeno s BioRender.com.

1.3.2. Aktivacija bradikininškog signalnog puta

U zdravim tkivima, BK djeluje vezujući se na konstitutivno izražen B2R (138). U upalnim stanjima pod utjecajem citokina dolazi do povećanja izražaja B2R-a te indukcije B1R-a, čiji je izražaj u fiziološkim uvjetima zanemariv (138–140). Kod ljudi, *BDKRB1* gen, koji kodira B1R, i *BDKRB2* gen, koji kodira B2R, dijele 36% homologije u genomskoj sekvenci te su međusobno udaljeni svega 12 kb na 14. kromosomu (141). Isti se geni kod miša nalaze na 12. kromosomu, a s humanim ortolozima dijele 70 – 80% homologije (127). U stanicama, oba su receptora smještena na staničnoj membrani i građena od jednog polipeptidnog lanca s izvanstaničnom N-terminalnom domenom i unutarstaničnom C-terminalnom domenom, a koji se proteže kroz membranu sedam puta, pri čemu tvori tri izvanstanične i tri unutarstanične petlje (134). Ovakva struktura tipična je za rodopsinsku porodicu receptora vezanih za G bjelančevine. N-terminalna domena u sebi sadrži glikozilacijska mjesta koja osiguravaju pravilan izražaj receptora na membrani, a C-terminalna domena fosforilacijska mjesta koja su

važna za inaktivaciju i endocitozu receptora nakon vezanja liganda (142). Inaktivacija i internalizacija receptora natrag u stanicu brza je kod B2R-a, dok je inaktivacija B1R-a toliko spora da ga se često opisuje kao konstitutivno aktivan receptor (143). Unutar stanice, B2R uglavnom djeluje putem α podjedinica G proteina (engl. *G-protein alpha subunits* – $G\alpha$) $G\alpha_q$ te u manjoj mjeri $G\alpha_i$, $G\alpha_s$ i $G\alpha_{12/13}$ (134). U endotelnim stanicama, aktivacijom B2R-a aktivira se signalni put fosfolipaze C (engl. *phospholipase C* – PLC) koji povećava unutarstaničnu koncentraciju kalcijevih iona (144). Fosfolipaza C, aktivirana $G\alpha_q$ proteinom, hidrolizira fosfolipid stanične membrane fosfatidil-inozitol-4,5-bisfosfat, pri čemu nastaju sekundarni glasnici diacilglicerol i inozitol-1,4,5-trifosfat (engl. *inositol 1,4,5-trisphosphate* – IP_3). Diacilglicerol odlazi u citoplazmu gdje aktivira protein kinazu C (engl. *protein kinase C* – PKC), a IP_3 potiče oslobađanje Ca^{2+} iz skladišta unutar endoplazmatske mrežice u citoplazmu (145). Kalcij, sam ili u kombinaciji s PKC, posreduje u aktivaciji mnogih enzima, uključujući endotelnu sintazu NO-a (engl. *endothelial nitric oxide synthase* – eNOS), koja proizvodi NO, te fosfolipazu A (engl. *phospholipase A* – PLA), koja sudjeluje u nastanku arahidonske kisline i prostaglandina (145,146). Prostaglandini i NO sintetizirani u endotelnim stanicama djeluju na glatke mišićne stanice stijenke žile, gdje stimuliraju proizvodnju cikličkog gvanozin monofosfata i cikličkog adenozin monofosfata, otvaranje kalijevih kanala, hiperpolarizaciju i relaksaciju (Slika 4) (127,147). Osim toga, B2R aktivira signalne puteve posredovane proteinskim kinazama aktiviranim mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinases* – MAPK) i Janus kinazama koji prvenstveno sudjeluju u proliferaciji i preživljenju stanica (148,149). Za vrijeme upale, i B2R i B1R aktiviraju transkripcijski čimbenik NF- κ B, koji se translocira u jezgru i potiče transkripciju citokina i drugih upalnih čimbenika, ali B1R ujedno aktivira i iNOS, čime u velikoj mjeri doprinosi oksidativnom stresu (138,150). Iako B1R također veže $G\alpha_q$ and $G\alpha_i$ te aktivira slične signalne puteve kao B2R, aktivacija ova dva receptora daje različit kalcijski odgovor unutar stanice. Aktivacija B2R-a uzrokuje prolazan porast u citoplazmatskoj razini Ca^{2+} zbog otpuštanja iz endoplazmatske mrežice, dok aktivacija B1R-a primarno potiče ulazak Ca^{2+} u stanicu otvaranjem ionskih kanala, zbog čega je porast u njegovoj unutarstaničnoj koncentraciji puno veći i dugoročniji (143).



Slika 4. Aktivacija bradikininskih receptora na endotelnim stanicama. Vezanjem kinina na bradikininski receptor tipa 2 i njihovih metabolita na bradikininski receptor tipa 1, u endotelnim stanicama dolazi do porasta iona kalcija zbog otpuštanja iz spremišta u endoplazmatskoj mrežici ili ulaska kroz ionske kanale iz međustaničnog prostora. Kalcij zajedno s protein kinazom C aktivira fosfolipazu A i endotelnu sintazu dušikova oksida, koji proizvode prostaglandine i dušikov oksid, time potičući relaksaciju glatkih mišićnih stanica stijenke krvnih žila i vazodilataciju. B1R – bradikininski receptor tipa 1; B2R – bradikininski receptor tipa 2; BK – bradikinin; cAMP – ciklički adenozin monofosfat; cGMP – ciklički gvanozin monofosfat; DAG – diacilglicerol; eNOS - endotelna sintaza dušikova oksida; ER – endoplazmatska mrežica; IP3 – inozitol 1,4,5-trifosfat; KD – kalidin; MAPK – proteinska kinaza aktivirana mitogenom; NO – dušikov oksid; PLA₂ – fosfolipaza A₂; PLC – fosfolipaza C; PKC – protein kinaza C. Prilagođeno iz (127). Izrađeno s BioRender.com.

1.3.3. Distribucija kalikrein-kininskog sustava i bradikininskih receptora unutar mozga i mrežnice

U mozgu i cerebrospinalnoj tekućini pronađene su sve komponente KKS-a koje sudjeluju u oslobađanju BK-a, kao i sam BK (151,152). Bradikininski receptori su u najvećoj mjeri izraženi u moždanoj kori, hipotalamusu, hipofizi, strijatumu, malom mozgu i moždanom

deblu i to uglavnom na neuronima, iako je njihov izražaj u staničnoj kulturi pokazan i na endotelnim stanicama, astrocitima, mikrogliji i oligodendrocitima (152–157).

U oku, dijelovi endogenog KKS-a, uključujući LK i TK te bradikininske receptore, nalaze se prvenstveno u mrežnici i žilnici, a u puno manjoj količini prisutni su i u vidnom živcu (engl. *ocular nerve* – ON) te cilijarnom tijelu (158). Unutar mrežnice, B2R je pronađen u vanjskom i unutrašnjem zrnatom sloju, sloju ganglijskih stanica te u endotelnim stanicama krvnih žila (158,159). U prisustvu upale u patološkim stanjima poput makularne degeneracije i dijabetičke retinopatije, izražaj B1R-a u mrežnici je kod ljudi potvrđen u endotelnim i glatkim mišićnim stanicama krvnih žila, astrocitima, Müllerovim stanicama i mikrogliji, a kod štakora u endotelnim, astrocitnim i Müllerovim stanicama, ali ne i mikrogliji (139,160).

1.3.4. Uloga bradikinina i njegovih receptora u razvoju edema nakon ishemije mozga i mrežnice

Bradikinin je među prvim čimbenicima upale koji se otpuštaju nakon ishemije. Kod miša i štakora, povišene razine BK-a, prekalikreina, PK-a i cijepanog HK-a detektirane su u plazmi i tkivu nakon ishemije mozga, a vrhunac dosežu otprilike 24 sata od inzulta (125,161–165). Porast u količini dostupnog BK-a nakon ishemije popraćen je i porastom u izražaju bradikininskih receptora na membranama oštećenih stanica, posebno neurona i astrocita (125,163). Osim toga, tPA koji se primjenjuje kao jedna od metoda liječenja ishemijskog moždanog udara, potiče glikozilaciju B2R-a u citoplazmi endotelnih stanica, što usmjerava B2R prema staničnoj membrani (166).

Do sada, najbolje je istražena uloga BK-a u razvoju sekundarne ishemijske ozljede poticanjem razvoja edema (167). Kod ljudi, uočena je povišena razina BK-a u cerebrospinalnoj tekućini nakon ishemijskog moždanog udara, čija visina korelira s težinom edema i porastom intrakranijskog tlaka (168). Većina pretkliničkih istraživanja pokazuje da su štetni učinci BK-a u akutnoj fazi ishemije mozga rezultat njegovog vezanja za B2R. S druge strane, postoje i istraživanja prema kojima inhibicija B1R-a, a ne B2R-a, dovodi do smanjenja razvoja edema, pa čak i prema kojima inhibicija B2R-a dovodi do pogoršanja ishemijskog oštećenja mozga (164,169). Primjenom antagonista B2R-a i uporabom miševa s onemogućenim *Bdkrb2* genom pokazano je da inhibicija B2R-a smanjuje oštećenje BBB-a, vazogeni edem, veličinu lezije i neurološko oštećenje u mišjem i štakorskom modelu ishemijskog moždanog udara (125,163,170–172). Štoviše, inhibicija B2R-a potiče preživljenje endotelnih stanica jer štiti

njihove mitohondrije od oksidativnog oštećenja te doprinosi očuvanju čvrstih spojeva koji su ključni za integritet BBB-a (163). Zaštitni učinak je veći što je nakon ishemije B2R ranije inhibiran, međutim pokazalo se da inhibicija B2R-a i 6,5 sati od ishemije još uvijek dovodi do značajnog poboljšanja (173). Ovo daje nadu da bi vremenski okvir djelotvorne primjene potencijalne terapije ishemijskog moždanog udara farmakološkom inhibicijom B2R-a mogao biti duži nego za trenutno dostupne metode liječenja. Zanimljivo je i da sam BK, ukoliko se primijeni prije nastupa ishemije, slično kao ishemijsko prekondicioniranje, doprinosi razvoju tolerancije mozga na ishemiju i ublažava ishemijsku ozljedu (174).

Pretpostavlja se da BK potiče razvoj edema i tijekom ishemiji mrežnice. Tome u prilog ide podatak da u normalnim uvjetima BK primijenjen intravitrealnom injekcijom kod štakora ili egzogeno dodan na izolirane žile štakorske mrežnice uzrokuje vazodilataciju i povećanu propusnost BRB-a (175,176). Kako istovjetna primjena des-Arg⁹-BK-a nije utjecala na tonus ni propusnost krvnih žila, proizlazi da su opisani učinci BK-a u normalnim uvjetima posljedica aktivacije B2R-a. Prema trenutnim podacima, čini se da BK u akutnoj fazi ishemije mrežnice ima više zaštitni nego štetni učinak. Miševi koji su nakon ishemije mrežnice uzrokovane podvezivanjem pterigopalatine i vanjske karotidne arterije prva dva dana intravenozno primali TK, a koji sudjeluje u nastanku BK-a, peti dan nakon ishemije pokazali su blaži funkcionalni deficit, manji gubitak ganglijskih stanica i manju propusnost BRB-a u usporedbi s netretiranim životinjama (177). Barem dio opaženih promjena mogao bi biti rezultat povećane fosforilacije i aktivacije eNOS-a te utišavanja proupalnog transkripcijskog čimbenika NF-κB, koji su pokazani kod tretiranih životinja (177). Dodatno, *in vitro* je pokazano da primjena BK-a štiti stanice primarne kulture neurona štakorske mrežnice od ekscitotoksičnog djelovanja povišene razine glutamata (178). Međutim, u mišjem modelu ishemije mrežnice uzrokovane naglim povećanjem intraokularnog tlaka, ni intraperitonealna primjena BK-a ni antagonista B2R-a netom prije izazivanja ishemije nisu utjecale na ishemijsku ozljedu (179).

1.3.5. Uloga bradikinina i njegovih receptora u odgovoru mikroglije na ishemiju mozga i mrežnice

Osim što utječe na destabilizaciju BBB-a i razvoj edema, aktivacija bradikininskog signalnog puta nakon ishemije utječe i na druge procese ishemijske kaskade koji doprinose razvoju ili oporavaku od ishemijske ozljede. Na primjer, sve je više pokazatelja da BK i njegovi receptori doprinose aktivaciji i migraciji rezidentne mikroglije nakon ishemije (180).

Unatoč obećavajućim rezultatima dobivenima *in vitro*, otkrivanje uloge BK-a u odgovoru mikroglije na ishemiju mozga i mrežnice *in vivo* tek je u začetcima. U primarnoj staničnoj kulturi mikroglija izražava oba tipa bradikininskih receptora: B2R je konstitutivno izražen, dok je izražaj B1R-a induciran primjenom BK-a (157). Aktivacija bradikininskih receptora na mikrogliji u normalnim uvjetima uzrokuje promjenu u koncentraciji unutarstaničnog Ca^{2+} i utječe na proizvodnju NO-a, ali nema utjecaja na preživljenje, veličinu stanica ili otpuštanje citokina IL-6, IL-1 β , COX-2 i TNF- α (181,182). Bakterijski toksin lipopolisaharid (engl. *lipopolysaccharide* - LPS) često se primjenjuje u staničnim kulturama zbog sposobnosti aktivacije mikroglije. Bradikinin smanjuje LPS-om inducirano oslobađanje NO-a, citokina IL-1 β i TNF- α te inhibira transkripcijski čimbenik NF- κ B, pri čemu posreduju oba bradikininska receptora (37–39). U drugom je pak istraživanju inhibicija B1R-a, ali ne i B2R-a, dovela do povećanog otpuštanja NO i TNF- α u aktiviranoj mikrogliji (80). Nedavno je pokazano da se izražaj B2R-a u mikrogliji ne mijenja pod utjecajem LPS-a, ali zato raste primjenom BK-a i plazmatskog prekalikreina te u dodiru sa staničnim ostatcima (181). Čini se da je primarni učinak BK-a na mikrogliju poticanje protuupalne funkcije aktivacijom primarno B1R-a, međutim u *in vitro* modelu ishemijsko-reperfuzijske ozljede u kokulturi neurona i mikroglije, inhibicija B1R-a pospješila je preživljenje stanica (183). S obzirom na velike razlike u eksperimentalnom dizajnu navedenih istraživanja, posebno u odabiru primarnih kultura ili imortaliziranih staničnih linija, teško je donijeti konkretne zaključke o ulozi BK-a u aktivaciji mikroglije. Također, vrlo je mali broj istraživanja koja se bave interakcijom bradikininskog signalnog puta i mikroglije *in vivo*. U miševa kojima nedostaje funkcionalni PK, uočen je smanjeni broj CD11b pozitivne mikroglije na području lezije mozga 24 sata nakon ishemije (161). U primarnim kulturama mikroglije iz miševa divljeg tipa te miševa bez funkcionalnog B1R-a ili B2R-a, pokazalo se da BK služi kao kemoatraktant koji aktivacijom B1R-a i ulaskom Ca^{2+} u stanice povećava pokretljivost i potiče migraciju mikroglije (184). U istoj je studiji, uspoređivanjem gustoće mikroglije 18 sati nakon žarišne ubodne ozljede mozga odraslih miševa divljeg tipa i miševa s nedostatkom B1R-a i B2R-a, pokazano da je nakupljanje mikroglije oko lezije inhibirano u nedostatku funkcionalnog B1R-a (184). Pritom ostaje nerazjašnjeno je li utjecaj BK-a na brojnost mikroglije *in vivo* rezultat djelovanja na migraciju ili proliferaciju stanica, budući da je pokazano da B2R može utjecati i na proliferaciju (185). S druge strane, u transgeničnom mišjem modelu Alzheimerove bolesti, inhibicija B1R-a je, umjesto očekivanog smanjenja CD11b pozitivnih stanica zbog smanjenog nakupljanja mikroglije, uzrokovala 50%-tno povećanje kortikalnog CD11b signala, dok inhibicija B2R-a nije imala značajnog utjecaja (80).

Iz navedenih istraživanja vidljivo je da uloga BK-a i njegovih receptora u ishemiji mozga i mrežnice nije u potpunosti razjašnjena. Čini se da aktivacija bradikininskog signalnog puta s jedne strane dovodi do sekundarnog ishemijskog oštećenja stvaranjem edema, a s druge pruža zaštitni učinak čuvajući živčane stanice od toksičnog djelovanja prekomjernog glutamata. Tu je i uloga BK-a u migraciji i aktivaciji mikroglije koja, ovisno o fenotipu, može djelovati i štetno i povoljno tijekom razvoja ishemijske ozljede. Budući da osobe oboljele od ishemijskog moždanog udara često istovremeno razvijaju i ishemiju mrežnice, posebno u prisutnosti šećerne bolesti, modulacija bradikininskog signalnog puta u terapijske svrhe zahtijeva preciznu definiciju uloge BK-a u ishemiji oba tkiva. Međutim, unatoč visokoj srodnosti među tkivima, aktivacija bradikininskog signalnog puta ne mora nužno imati jednak učinak u ishemiji mozga i mrežnice.

1.3.6. Utjecaj šećerne bolesti na bradikininski signalni put

Bradikininski signalni put i KKS sve češće se spominju u istraživanjima razvoja šećerne bolesti i njenih vaskularnih komplikacija poput dijabetičke nefropatije, retinopatije, hiperalgezije i hipertrofije (186–188). Utjecaj šećerne bolesti na izražaj i aktivnost KKS-a varira ovisno o istraživanju. Neka istraživanja pokazuju da šećerna bolest dovodi do povećane aktivnosti i razine PK-a i TK-a u plazmi te povišene razine TK-a i BK-a u bubrezima (186,189,190). Druge pak studije prijavljuju da nema razlike u razini PK-a i BK-a u krvi osoba sa ili bez šećerne bolesti te čak da osobe u preddijabetičkom stanju imaju smanjenu aktivnost KKS-a i nižu razinu BK-a (190,191). U eksperimentalnim modelima dijabetesa kod miša i štakora, povišene razine kinina, PK-a i TK-a potvrđene su u srcu, aorti, bubrezima i mrežnici (190,192,193). Posebno je značajan utjecaj šećerne bolesti na izražaj bradikininskih receptora. I kod ljudi i kod miševa i štakora pokazano je da šećerna bolest inducira izražaj B1R-a te potiče izražaj B2R-a u raznim tkivima (139,175,176,186,187,194,195). Povišen izražaj B1R i B2R rezultat je hiperglikemije i sistemske upale, odnosno povišene količine cirkulirajućih ROS molekula i proupalnih citokina (187,196,197). Inhibicija B1R-a u dijabetičkim životinjama smanjuje hiperglikemiju te vaskularnu permeabilnost, oksidativni stres, upalu i leukocitozu, naročito u mrežnici (139,175,176,198–201). S druge strane, inhibicija B2R-a u streptozotocinskom modelu šećerne bolesti kod štakora nije utjecala na razinu glukoze u krvi, iako aktivacija B2R-a *in vitro* potiče izlučivanje inzulina u β stanicama gušterače te translokaciju prijenosnika glukoze tipa 4, glukoznog prijenosnika u izoliranom skeletnom mišićju pretilih štakora (200,202,203). Moguće je da šećerna bolest mijenja ulogu B1R-a i

B2R-a, što je primijećeno i u istraživanjima ishemijske ozljede mozga kod dijabetičnih životinja.

Na štakorima kojima je izazvana ishemija mozga, pokazano je da je ishemijom uzrokovan porast u izražaju B1R-a veći, a B2R-a manji u prisustvu šećerne bolesti (140). Štoviše, inhibicija B1R-a u dijabetičkim životinjama imala je zaštitan učinak na razvoj lezije zbog smanjenja upale i poremećaja BBB-a, dok je inhibicija B2R-a dovela do pogoršanja u razvoju lezije u subakutnoj fazi (140). Ista je grupa istraživača godinu dana kasnije pokazala da pojačani izražaj B1R-a kod dijabetičkih životinja doprinosi razvoju hemoragijske transformacije u ranoj fazi ishemijske ozljede (204). Suprotno utjecaju B2R-a u razvoju ishemijske ozljede kod životinja bez šećerne bolesti, aktivacija B2R-a kod dijabetičnih životinja smanjuje razvoj edema, veličinu lezije, poboljšava funkcionalni oporavak te štiti neurone od apoptoze pokretanjem signalnog puta kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (*engl. extracellular signal-regulated kinase*) (205). Slična promjena u djelovanju bradikininских receptora pod utjecajem šećerne bolesti uočena je i u razvoju edema šape dijabetičnih štakora. Primijećeno je da aktivacija B2R-a ima puno slabiji, a aktivacija B1R-a puno jači učinak na razvoj edema u prisustvu šećerne bolesti nego u normalnim uvjetima (206).

U ovom istraživanju, korištenjem eksperimentalnog modela moždanog udara kod kojeg dolazi do simultanog prekida perfuzije oftalmičke arterije i srednje moždane arterije, istražili smo utjecaj šećerne bolesti na ishemijsku ozljedu mozga i mrežnice u akutnoj fazi te izražaj bradikininских receptora u mozgu i mrežnici prije i nakon ishemije. U tu svrhu korišten je Akita genetski mišji model T1D-a koji je bolje okarakteriziran i manje varijabilan od dostupnih mišjih modela T2D-a. Nadalje, uključenjem životinja sa ili bez šećerne bolesti i s onemogućenim *Bdkrb2* genom, istražili smo ulogu BK-a i njegovih receptora u razvoju moždanog i mrežničnog edema i odgovoru mikroglije na ishemiju mozga i mrežnice te provjerili mijenja li se ta uloga, i na koji način, u prisustvu šećerne bolesti.

2. HIPOTEZA

Proupalna uloga bradikinina u ishemiji mozga i mrežnice izraženija je u šećernoj bolesti, a očituje se većim edemom te pojačanom aktivacijom i migracijom mikroglije.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Opći cilj istraživanja je odrediti kako šećerna bolest utječe na ulogu bradikininskog signalnog puta u razvoju edema te aktivaciji i migraciji mikroglije u mišjem modelu ishemijske ozljede mozga i mrežnice.

3.2. Specifični ciljevi

U svrhu potvrđivanja hipoteze, određen je niz specifičnih ciljeva:

1. Odrediti utjecaj šećerne bolesti na promjenu genskog i proteinskog izražaja B1R-a i B2R-a u mozgu i mrežnici nakon ishemijske ozljede kod miševa sa i bez šećerne bolesti.
2. Odrediti utjecaj šećerne bolesti na razvoj edema mozga i mrežnice nakon ishemijske ozljede kod WT i B2R-KO miševa sa i bez šećerne bolesti snimanjem magnetskom rezonancijom i fluoresceinskom angiografijom.
3. Odrediti utjecaj šećerne bolesti na migraciju i proliferaciju mikroglije u mozgu i mrežnici nakon ishemijske ozljede imunohistokemijski kod WT i B2R-KO miševa sa i bez šećerne bolesti.
4. Istražiti međuovisnost migracije mikroglije i razvoja edema nakon ishemijske ozljede mozga i mrežnice te moguće razlike u šećernoj bolesti.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Pokusne životinje

Ovo istraživanje provedeno je na 3 do 4 mjeseca starim muškim miševima s dijabetesom tipa 1 soja C57BL/6-*Ins2*^{Akita}/J (Akita), miševima s dijabetesom tipa 1 i s onemogućenim genom za B2R soja B6.Cg-*Ins2*^{Akita}/*Bdkrb2*^{tm1Jfh/SmiJ} (Akita/B2R-KO) te njihovim nedijabetičnim kontrolama, miševima divljeg tipa soja C57BL/6J (WT) i miševima s onemogućenim genom za B2R soja C57BL/6J/*Bdkrb2*^{tm1Jfh/SmiJ} (B2R-KO). Točkasta mutacija u *Ins2* genu kod Akita i Akita/B2R-KO miševa mijenja konformaciju (Cys96Tyr) u genu za inzulin 2 što dovodi do prekida veze između A i B lanaca inzulina uzrokujući njegovo nakupljanje unutar β stanica gušterače (207,208). Unutarstanično nakupljanje neispravno savijenog proinzulina djeluje citotoksično na stanice i one ubrzano ulaze u apoptozu, posljedično dovodeći do smanjenog izlučivanja inzulina (208). Miševi korišteni u pokusima heterozigotni su za točkastu mutaciju u *Ins2* genu. Hiperglikemiju, hipoinzulinemiju, polidipsiju i poliuriju, simptome tipične za dijabetes tipa 1 razvijaju već tri tjedna nakon rođenja (209). Akita/B2R-KO i B2R-KO miševi ne posjeduju funkcionalni B2R zbog delecije eksona 4 koji sadrži kompletnu kodirajuću sekvencu *Bdkrb2* gena na oba alela (210). Miševi bez funkcionalnog B2R i dalje su vijabilni, fertilni i bez očitih morfoloških promjena u razvoju.

Sva 4 soja miševa kupljena su iz komercijalnog uzgoja životinja Jackson Laboratories (Bar Harbor, SAD) te dalje uzgajana u Nastambi za laboratorijske životinje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, uz neometan pristup hrani i vodi te 12-satni ciklus svjetlo/tama. Sve životinje genotipizirane su prilikom razdvajanja prema spolu s navršениh 2 mjeseca starosti. U istraživanje je uključeno ukupno 96 životinja, 24 miša po skupini.

Eksperimentalni postupci na laboratorijskim životinjama odobreni su od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te provedeni u Nastambi za laboratorijske životinje (HRPOK-006) i Laboratoriju za regenerativnu neuroznanost (HRPOK-006), u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/17, 32/19), Izmjenama i dopunama Zakona o zaštiti životinja (NN 37/13) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13).

4.2. Genotipizacija miševa

4.2.1. Izolacija DNA iz vrška repa miša

Prilikom razvrstavanja miševa u kaveze u Nastambi za laboratorijske životinje (HRPOK-006) prikupljen je uzorak vrška repa svake životinje iz kojeg je izolirana deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid* – DNA) potrebna za genotipizaciju. Odrezani vršak repa inkubiran je preko noći na 56°C u 500 µl otopine za izolaciju i 10 µl proteinaze K (20 mg/ml, MC5005, Promega, Madison, SAD). Otopina za izolaciju sadržavala je 50 mM Tris baze (pH = 8, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), 100 mM etilendiamintetraoctene kiseline (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid* – EDTA) (pH = 8, Kemika, Zagreb, Hrvatska), 100 mM NaCl (Kemika) i 1% natrijevog dodecil-sulfata (engl. *sodium dodecyl sulfate*) (Sigma-Aldrich). Idući dan, uzorci su centrifugirani na 14000 rpm (engl. *rounds per minute*) 20 minuta na sobnoj temperaturi u uređaju Centrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg, Njemačka), nakon čega je supernatant prebačen u novu tubicu u koju je prethodno dodano 500 µl izopropanola (Kemika). Sadržaj tubice je protresen nekoliko puta kako bi se istaložila DNA, a uzorci su potom centrifugirani na 14000 rpm 5 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se pelet DNA zalijepio za dno tubice. Supernatant je uklonjen, a pelet je nekoliko puta ispran dodavanjem sterilnog 70%-tnog etanola (Kemika) i centrifugiranjem na 14000 rpm po 2 minute. Nakon zadnjeg ispiranja, pelet je ostavljen u otvorenoj tubici na sobnoj temperaturi dok nije ispario sav etanol i potom resuspendiran u 200 µl sterilne vode (Voda za injekcije, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb, Hrvatska). Otopljena DNA dodatno je prokuhana u termobloku ThermoMixer C (Eppendorf) na 70°C s otvorenim poklopcem i konačno pohranjena na 4°C.

4.2.2. Umnažanje DNA metodom lančane reakcije polimerazom (PCR)

Genotipizacija miševa provedena je metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction* – PCR).

Genotipizacija Akita miševa nosilaca točkaste mutacije *Ins2* gena provedena je prema protokolu dostupnom u literaturi (211). Korišten je par vanjskih početnica Ins2-OF 5'-GCG AGA AAA CCT GGG GTA GT-3' i Ins2-OR 5'-TAC CAG CCC CAC TCA TGT CT-3' komplementarnih i mutiranom Akita i divljem tipu alela te par unutarnjih početnica InsWT-

InF 5'-AGA AGC GTG GCA TTG TAG ATC AGT GTT G-3' komplementarna isključivo divljem tipu alela i Akita-InR 5'-GCT GGT AGA GGG AGC AGA TGC TGT TGT-3' komplementarna isključivo mutiranom Akita alelu. PCR reakcija provedena je u ukupnom volumenu od 25 µl u koji je dodano 0,125 µl GoTaq G2 polimeraze (5U/µl, Promega), 5 µl GoTaq pufera (5x, Promega), 0,5 µl smjese dNTP-ova (Promega), 1 µl MgCl₂ (25mM, Promega), 13,375 µl sterilne vode, 1 µl početnica te 1 µl genomske DNA. Ciljana DNA umnožena je u PCR uređaju 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Waltham, SAD). Početna denaturacija provedena je inkubacijom 3 minute na 94°C, nakon čega su slijedila 33 ciklusa po 30 s denaturacije na 94°C, 25 s vezanja primera na 65°C i 45 s umnažanja na 72°C. Za završni korak umnažanja uzorci su inkubirani 5 minuta na 72°C.

Za genotipizaciju miševa koji nose deleciju u *Bdkrb2* genu za B2R korišten je službeni protokol (broj 28234, verzija 4.2) dostupan na stranicama tvrtke Jackson Laboratories. Korištena je smjesa četiri početnice IMR0434 5'-TGT CCT CAG CGT GTT CTT CC-3', IMR0435 5'-GGT CCT GAA CAC CAA CAT GG-3', IMR6916 5'-CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC-3' i IMR6917 5'-AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC-3'. Reakcija je provedena na 1 µl izolirane genomske DNA u ukupnom volumenu od 25 µl. Korišten je identičan sastav reakcijske smjese kao kod genotipizacije Akita miševa: 0,125 µl GoTaq G2 polimeraze (5U/µl, Promega), 5 µl GoTaq pufera (5x, Promega), 0,5 µl smjese dNTP-ova (Promega), 1 µl MgCl₂ (25mM, Promega), 13,375 µl sterilne vode, 1 µl početnica te 1 µl genomske DNA. Korišten je sljedeći program umnažanja: 2 minute na 94°C, 10 ciklusa po 20 s na 94°C, 15 s na 65°C (- 0,5°C/ciklusu) i 10 s na 68°C, zatim 28 ciklusa po 15 s na 94°C, 15 s na 60°C i 10 s na 72°C te na kraju 2 minute na 72°C.

4.2.3. Razdvajanje produkata PCR reakcije elektroforezom

Produkti umnažanja *Ins2* gena razdvojeni su elektroforezom na 3%-tnom agaroznom gelu. Miševi s alelima divljeg tipa dali su produkte veličine 188 i 378 parova baza (engl. *base pairs* – bp), miševi s oba mutirana alela produkte veličine 243 i 378 bp, a miševi heterozigotni za Akita mutaciju produkte veličina 188, 243 i 378 bp.

Produkti umnažanja *Bdkrb2* gena razdvojeni su elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu. Miševi s oba alela divljeg tipa dali su produkt veličine 361 bp, miševi

homozigotni za mutirani alel produkt veličine 280 bp, a heterozigotni miševi produkte veličina 280 i 361 bp.

U svrhu pripreme gela za elektroforezu, agarozu je pomiješana s 1X Tris-acetatnim EDTA, odnosno TAE puferom. Pufer je pripremljen u 10X koncentraciji miješanjem 48,4 g Tris baze, 11,4 ml ledene octene kiseline (Kemika), 3,7 g EDTA i deionizirane vode u volumenu od 1l. U zagrijanu otopinu dodano je 5 µl fluorescentne boje GelRed (10000x, Biotium, SAD). Otopina za gel izlivena je u kadicu sustava za elektroforezu PS 304 minipac (Biometra, Njemačka) nakon čega je brzo umetnut češljic za formiranje jažica. Nakon polimerizacije gela, u jažice su nanoseni uzorci DNA i biljeg veličina BenchTop 100bp DNA Ladder (Promega). Kao pufer za migraciju tijekom elektroforeze korišten je također 1X TAE. Elektroforeza se odvijala pod naponom od 10 – 15 mV/cm. Nakon elektroforeze, produkti su vizualizirani UV lampom Smartdoc (Accuris Instruments, SAD) i snimljeni pametnim telefonom.

4.3. Potvrda šećerne bolesti i određivanje glikemijskog statusa miševa

Za potvrdu šećerne bolesti kod Akita sojeva te za usporedbu glikemijskog statusa među korištenim sojevima, na početku pokusa svim miševima uključenima u istraživanje izmjerena je koncentracija bazalne glukoze (prije gladovanja), glukoze natašte (nakon gladovanja) i razina glikoziliranog hemoglobina u krvi. U WT i B2R-KO miševa je dodatno proveden intraperitonealni test tolerancije na glukozu (engl. *intraperitoneal glucose tolerance test - IPGTT*) kako bi se izuzeo moguć utjecaj nedostatka B2R-a na metabolizam glukoze. Sva mjerenja provedena su u istom danu, na budnim životinjama, iz uzorka krvi repne vene.

Na dan testiranja, u jutarnjim satima, životinje su prvo izvagane i potom imobilizirane pod improviziranim plastičnim držačem. Rep, koji je izvan držača, položen je nekoliko minuta na prijenosni grijač (Wedze grijači za ruke i stopala, Decathlon, Villeneuve-d'Ascq, Francuska) kako bi se potaknula cirkulacija krvi i dilatacija repnih vena. Oštrim žiletom napravljen je mali rez na bočnoj strani repa, u području repne vene. Prva se kap krvi uklonila sterilnom gazom, a druga prikupila jednokratnim spremnikom za uzorkovanje krvi koji dolazi u setu s uređajem za određivanje razine glikoziliranog hemoglobina A1C Now® Self Check (PTS Diagnostics, Indianapolis, SAD). Spremnik je nekoliko puta protresen i uzorak je nanosen na mjerni uložak umetnut u uređaj prema uputama proizvođača. Nakon 5 minuta očitane su i zabilježene izmjerene vrijednosti glikoziliranog hemoglobina. Laganim masiranjem repa potaknuta je još

jedna kap iz istog reza iz koje je izmjerena koncentracija bazalne glukoze pomoću glukometra Rightest GM 550 (Bionime, Taichung City, Tajvan). Kapljica krvi kapilarno je povučena testnom trakicom umetnutom u glukometar, te su 5 s od uzimanja uzorka krvi očitane i zabilježene izmjerene vrijednosti. Životinje su potom prebačene u novi kavez s čistom steljom kako bi idućih 6 sati provele u gladovanju, bez hrane, ali sa slobodnim pristupom vodi. Po isteku gladovanja, životinjama je istim postupkom kao kod mjerenja bazalne glukoze u krvi izmjerena i koncentracija glukoze natašte.

Odmah po mjerenju glukoze, natašte, kod WT i B2R-KO sojeva uslijedio je IPGTT. Životinjama je intraperitonealno (i.p.) primijenjena 20%-tna glukoza (Braun, Kronberg, Njemačka) u fiziološkoj otopini u dozi od 1,0 g/kg. Koncentracija glukoze u krvi izmjerena je i zabilježena nakon 15, 30, 60 i 120 minuta od primjene glukoze. S obzirom na visoke razine glukoze u krvi i nakon 6-satnog gladovanja, IPGTT se nije provodio na Akita i Akita/B2R-KO miševima kako bi se izbjegao mogući gubitak životinja zbog rizika razvoja hiperglikemijske kome i smrtnog ishoda izazvanih injekcijom glukoze. Po završetku svih mjerenja, životinjama je vraćena hrana u kaveze.

4.4. Neinvazivno mjerenje krvnog i intraokularnog tlaka na anesteziranim miševima

U svrhu izuzeća utjecaja razlika u krvnom ili intraokularnom tlaku na ishemijsko oštećenje, prije operativnog zahvata svim životinjama izmjereni su krvni i intraokularni tlak. Posebna pažnja posvećena je održavanju istih uvjeta prilikom svakog mjerenja kako bi se smanjio utjecaj vanjskih čimbenika poput doba dana u kojemu se vrši mjerenje, temperature, stresa i trajanja anestezije na izmjerene vrijednosti tlaka.

Životinje su uspavane u indukcijskoj komori 3,5%-tnim izofluranom (Isoflurane, Piramal Critical Care, Bethlehem, SAD) u mješavini plinova 70/30% N₂/O₂ do trenutka prestanka spontanih pokreta tijela i vibrisa. Tijekom mjerenja anestezija je održavana 2%-tnim izofluranom. Uspavani miš stavljen je na grijaču podlogu s njuškom položenom u masku za anesteziju te mu je umetnuta rektalna sonda za mjerenje tjelesne temperature. Tijekom mjerenja, tjelesna temperatura održavana je u rasponu od 38,5 – 39°C pomoću grijače podloge, a stopa disanja u rasponu od 90 – 100 udisaja po minuti podešavanjem anestezije putem sustava za nadzor vitalnih funkcija i upravljanje anestezijom (Medres – medical research GmbH, Köln, Njemačka).

Prvo je uslijedilo mjerenje intraokularnog tlaka pomoću tonometra za glodavce (TonoLab tonometer for rodents, Icare, Vantaa, Finska) koji očni tlak određuje prema usporavanju i vremenu odbijanja sonde nakon kontakta s rožnicom. Sva mjerenja intraokularnog tlaka provedena su unutar 5 minuta od stavljanja životinje u indukcijsku komoru, kako bi se smanjio utjecaj anestezije. Intraokularni tlak mjeren je naizmjenice 6 puta na oba oka pri čemu se pazilo da sonda uvijek dodiruje središnji dio rožnice. Za konačnu vrijednost intraokularnog tlaka uzeta je srednja vrijednost svih mjerenja. Po završetku mjerenja oči su prekrivene oftalmičkim lubrikantom (Recugel, Bausch and Lomb, Laval, Kanada) kako bi se spriječilo isušivanje rožnice.

Krvni tlak izmjeren je CODA sustavom za neinvazivno mjerenje tlaka pomoću repnih manžeta (CODA Surgical Monitor, Kent Scientific, Torrington, SAD). Mišu zagrijanom na 38,5°C namještena je na bazu repa prvo okluzijska manžeta (engl. *occlusion cuff*) koja ritmičkim stezanjem i opuštanjem regulira protok krvi kroz rep, a otprilike 2 mm ispod nje manžeta koja mjeri sistolički i dijastolički krvni tlak određivanjem volumena krvi u repu (engl. *volume pressure recording cuff*). Obje manžete spojene su na CODA uređaj koji je povezan s prijenosnim računalom preko kojeg su postavljeni parametri mjerenja i automatski pohranjene izmjerene vrijednosti krvnog tlaka. Na svakoj životinji provedeno je 5 aklimatizacijskih i 15 pravih ciklusa mjerenja s pauzom od 5 s između ciklusa, vremenom opuštanja okluzijske manžete od 20 s te donjom granicom detekcije volumena krvi od 15 µl. Ukoliko je više od 5 pravih ciklusa bilo neuspješno ili je standardna devijacija između pojedinačnih ciklusa bila veća od 30, dobivena vrijednost krvnog tlaka smatrala se nepouzdanom i izbačena je iz daljnje analize.

4.5. Izazivanje ishemijskog oštećenja mozga i mrežnice

Istovremeno ishemijsko oštećenje mozga i mrežnice izazvano je intraluminalnom okluzijom srednje moždane arterije (engl. *middle cerebral artery occlusion*- MCAO) u trajanju od 30 minuta.

Preoperativno, životinjama je i.p. dano 0,2 ml fiziološke otopine (Braun) te analgetik buprenorfin (Buprenoret, Bayer, Leverkusen, Njemačka) u dozi od 0,05 mg/kg. Anestezija je inducirana 4%-tnim izofluranom u kisiku, a tijekom zahvata održavana je 1,5%-tnim izofluranom u kisiku korištenjem vaporizatora (Kent Scientific). Anestezirana životinja

stavljena je na grijaču podlogu kako bi se tijekom zahvata tjelesna temperatura održala na 37°C, s njuškom položenom u masku za anesteziju i očima zaštićenima oftalmičkim lubrikantom (Recugel, Bausch and Lomb). Relativni protok krvi u mozgu u području irigacije srednje moždane arterije praćen je prislanjanjem sonde laserskog Dopplerovog mjerača protoka moorVMS-LDF (Moor Instruments Inc., Axminster, UK) na površinu lubanje u području lijevog temporalnog režnja. Kako bi se oslobodio pristup lubanji i distalnom dijelu srednje moždane arterije, na tom je mjestu pod operacijskim mikroskopom napravljen rez kože te je odmaknut temporalni mišić. Relativni protok izmjeren je prije zahvata, na početku i na kraju 30-minutnog perioda ishemije te nakon vađenja kirurškog konca obloženog silikonom kako bi se potvrdila reperfuzija.

Operativni zahvat izveden je pod operacijskim mikroskopom Olympus SZ-STU2 (Olympus, Tokyo, Japan). Anestezirani miš polegnut je na leđa s njuškom u maski za anesteziju, ispod vrata stavljen je potporni jastučić, a udovi su fiksirani za grijaču podlogu medicinskom trakom. Izloženo ventralno područje vrata obrijano je električnim brijačem (Aesculap Vega shaver, AgnTho's AB, Lidingö, Švedska) te potom dezinficirano 70%-tnim etanolom. U pripremi operativnog polja napravljen je rez u području vrata, odmaknute su žlijezde slinovnice te je umetnut retraktor (Colibri Retractors, Cat. # 17000-02, F.S.T., Foster City, SAD) kako bi se pridržale i razmakle slinovnice i koža. Lijeva zajednička karotidna arterija te lijeva vanjska i unutarnja karotidna arterija oslobođene su od okolnog vezivnog tkiva i živaca pazeći da se pritom ne ošteti n. vagus. Zatim su 6-0 kirurškim koncem (Black Braided Silk suture thread, F.S.T.) napravljena dva čvora na zajedničkoj karotidnoj arteriji, tako da je prvi čvor čvrsto svezan nisko na zajedničkoj karotidnoj arteriji, a drugi labavo svezan što bliže račvištu vanjske i unutarnje karotidne arterije. Iznad drugog labavog čvora postavljene su samozatvarajuće pincete (Fine Forceps – Self-Closing, #11261-30, F.S.T.) kako bi se spriječio retrogradni protok krvi. Između čvorova napravljen je zasjek škarcama za mikrodisekciju (Cohan-Vannas Spring Scissors, #15000-02, F.S.T.) kroz koji je uveden kirurški konac obložen silikonom (7019910 – 6023910, Docol Company, Sharon, SAD). Nakon uklanjanja samozatvarajuće pincete, konac je poguran kroz unutarnju karotidnu arteriju sve do mjesta račvanja srednje moždane arterije, karakteriziranog laganom otporom koji otežava daljnje uvođenje silikoniziranog konca. Stezanjem drugog čvora ispod račvišta, konac je zadržan u toj poziciji 30 minuta, tijekom kojih dolazi do ishemijskog oštećenja mozga. Pravilno pozicioniranje silikoniziranog konca potvrđeno je laserskim Dopplerovim mjeračem protoka, koji u slučaju uspješnog izazivanja ishemije bilježi pad protoka krvi kroz distalni dio srednje

moždane arterije od 70 – 80% u odnosu na početno stanje. U toj poziciji, umetnuti silikonizirani konac zatvara i mjesto grananja pterigopalatine arterije, iz koje se u glodavaca grana oftalmička arterija, čime istovremeno dolazi i do ishemijskog oštećenja lijevoga oka. Nakon 30 minuta silikonizirani konac izvađen je kako bi se omogućila reperfuzija. Zajednička karotidna arterija u ovom modelu ostaje trajno ligirana. Naposljetku, rana je zašivena 4-0 kirurškim koncem, a mišu je postoperativno i.p. dano 0,25 ml fiziološke otopine te analgetik buprenorfin u dozi od 0,05 mg/kg.

Postoperativno, životinje su prvih 24 sata smještene u kavez na grijanoj podlozi s omekšanom hranom i vodom dostupnima *ad libitum*. Prva dva dana nakon operacije, miševima je dnevno i.p. dano 0,25 ml fiziološke otopine radi sprječavanja dehidracije te buprenofin u dozi od 0,05 mg/kg za analgeziju.

4.6. *In vivo* praćenje razvoja ishemijske ozljede mišjeg mozga i mrežnice

4.6.1. Procjena neurološkog oštećenja

Sedam dana prije te na 1. i 3. dan nakon izazivanja ishemijske ozljede, miševi su podvrgnuti procjeni neurološkog oštećenja modifikacijom metode opisane u prijašnjim radovima (212,213). Miševi su bodovani u više kategorija i potkategorija prema kriterijima navedenima u Tablici 1. Težina neurološkog oštećenja proporcionalna je zbroju dobivenih bodova, čiji maksimum iznosi 42 boda. Uz to, zasebno je bodovan gubitak tjelesne mase nakon MCAO zahvata u odnosu na masu prije zahvata. Gubitak manji od 5% tjelesne mase bodovan je 1 bodom, gubitak od 5% do ispod 15% tjelesne mase bodovan je s 2 boda, a gubitak od 15% do 20% početne tjelesne mase bodovan je s 3 boda.

Tablica 1. Kriteriji bodovanja neurološkog oštećenja nakon izazivanja ishemijske ozljede.

KATEGORIJA	BROJ BODOVA
1. Izgled	1.1. Izgled dlake: 0 bodova – uredna i glatka dlaka 1 bod – lokalizirana piloerekcija 2 boda – neuredna dlaka, globalna piloerekcija

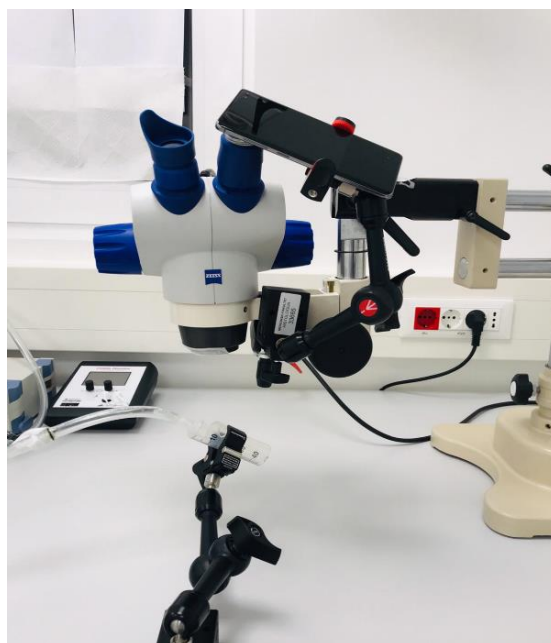
	<p>1.2. Položaj ušiju:</p> <p>0 bodova – uši stoje uspravno 1 bod – uši položene lateralno 2 boda – uši položene unazad</p> <p>1.3. Izgled ipsilateralnog (lijevog) oka:</p> <p>0 bodova – oko je bistro i širom otvoreno 1 bod – oko je suženo 2 boda – oko je suženo i prekriveno bistrom sluzi 3 boda – oko je suženo i prekriveno gustom sluzi 4 boda – oko je u potpunosti zatvoreno</p> <p>1.4. Izgled kontralateralnog (desnog) oka:</p> <p>0 bodova – oko je bistro i širom otvoreno 1 bod – oko je suženo 2 boda – oko je suženo i prekriveno bistrom sluzi 3 boda – oko je suženo i prekriveno gustom sluzi 4 boda – oko je u potpunosti zatvoreno</p> <p>1.5. Držanje tijela:</p> <p>0 bodova – ravno držanje 1 bod – slaba pogrbljenost 2 boda – umjerena pogrbljenost 3 boda – izrazita pogrbljenost</p>
<p>2. Pokretljivost, spontana aktivnost</p>	<p>0 bodova – normalna pokretljivost i spontana aktivnost 1 bod – blago smanjena spontana aktivnost 2 boda – micanje udova bez aktivnog kretanja 3 boda – kretanje samo uz podražaj 4 boda – nema odgovora na podražaj, normalni mišićni tonus 5 bodova – gubitak mišićnog tonusa, premortalno stanje</p>
<p>3. Poremećaji hoda</p>	<p>0 bodova – ravno hodanje 1 bod – ravno hodanje u kontralateralnu stranu 2 boda – naizmjenično hodanje ravno i u krug 3 boda – hodanje u krug 4 boda – hodanje u krug uz dodatne poremećaje u hodu 5 bodova – njihanje ili bez pokreta</p>

<p>4. Fleksija prednjih udova prilikom držanja životinje za rep</p>	<p>0 bodova – normalna fleksija udova 1 bod – gubitak fleksije na jednom udu 2 boda – gubitak fleksije na oba uda</p>
<p>5. Uvijanje prsnog koša prilikom držanja životinje za rep</p>	<p>0 bodova – uvijanje u obje strane 1 bod – uvijanje samo u jednu stranu 2 boda – bez uvijanja</p>
<p>6. Stupanj otpora pri bočnom pritisku</p>	<p>0 boda – jaki otpor 1 bod – slabi otpor 2 boda – nema otpora</p>
<p>7. Položaj ipsilateralne prednje šape</p>	<p>0 bodova – oslanjanje na podlogu punom šapom 1 bod – oslanjanje na podlogu prstima šape 2 boda – bez oslanjanja na podlogu, šapa stoji u zraku</p>
<p>8. Položaj kontralateralne prednje šape</p>	<p>0 bodova – oslanjanje na podlogu punom šapom 1 bod – oslanjanje na podlogu prstima šape 2 boda – bez oslanjanja na podlogu, šapa stoji u zraku</p>
<p>9. Osjetilni i refleksni odgovori</p>	<p>9.1. Refleks zaprepaštenja: 0 bodova – životinja se trzne na glasni pljesak rukama 1 bod – nema reakcije na glasni pljesak rukama</p>
	<p>9.2. Podražaj vibrisa na ipsilateralnoj strani: 0 bodova – životinja odmiče glavu pri laganom dodiru vibrisa 1 bod – nema reakcije na dodir</p>
	<p>9.3. Podražaj vibrisa na kontralateralnoj strani: 0 bodova – životinja odmiče glavu pri laganom dodiru vibrisa 1 bod – nema reakcije na dodir</p>
	<p>9.4. Podražaj uške na ipsilateralnoj strani: 0 bodova – refleksni odgovor uške na lagani dodir štapićem 1 bod – nema reakcije na dodir</p>
	<p>9.5. Podražaj uške na kontralateralnoj strani: 0 bodova – refleksni odgovor pine na lagani dodir štapićem 1 bod – nema reakcije na dodir</p>

	<p>9.6. Propriocepcija ipsilateralne prednje šape:</p> <p>0 bodova – životinja odmiče šapu uslijed laganog pritiska</p> <p>1 bod – nema reakcije na lagani pritisak šape</p>
	<p>9.7. Propriocepcija kontralateralne prednje šape:</p> <p>0 bodova – životinja odmiče šapu uslijed laganog pritiska</p> <p>1 bod – nema reakcije na lagani pritisak šape</p>

4.6.2. Fotografija i fluoresceinska angiografija očne pozadine i analiza slika

Patološke promjene na mrežnici miševa uzrokovane ishemijom praćene su fotografijom i fluoresceinskom angiografijom očne pozadine, snimanima sedam dana prije te na 1. i 3. dan nakon izazivanja ishemijske ozljede. Za to je korišten sustav za snimanje digitalnih slika očne pozadine vlastite izrade sastavljen od prilagodljivog držača za miševu spojenog na sustav za inhalacijsku anesteziju, rukom držane širokokutne oftalmološke lupe te operacijskog mikroskopa s pričvršćenom kamerom pametnog telefona i parom pomičnih kromatskih filtera (Slika 5).



Slika 5. Operacijski mikroskop pretvoren u platformu za fotografiju i fluoresceinsku angiografiju očne pozadine.

Miševi su anestezirani u indukcijskoj komori 4%-tnim izofluranom u kisiku, a tijekom snimanja anestezija je održavana 1,5%-tnim izofluranom u kisiku korištenjem vaporizatora.

Anestezirani miš je osiguran ispod mikroskopa Olympus SZ-STU2 (Olympus) u mobilnom držaču, s njuškom umetnutom u masku za anesteziju. Radi održavanja tjelesne temperature miša, oko držača je omotan prijenosni grijač. Na svako oko nanescena je kap 1%-tne otopine tropikamida (Mydriacyl 1%, Alcon, Geneva, Švicarska) kako bi se potaknulo širenje zjenica. Nakon nekoliko minuta potrebnih za nastup prikladne midrijaze, tropikamid je kapilarno uklonjen papirnatim ručnikom ne dirajući rožnicu. Na ipsilateralno oko dodana je kap umjetnih suza (Vizol S 0,4%, JGL, Rijeka, Hrvatska) radi postizanja bolje oštine slike, dok je drugo oko prekriveno oftalmičkim gelom (Recugel, Bausch and Lomb) radi prevencije isušivanja rožnice. Miš je položen tako da je oko u središtu vidnog polja mikroskopa te je nakon toga pokrenuto snimanje na pametnom telefonu Samsung Galaxy S10+ (Samsung, Suwon-si, Južna Koreja). Iznad oka, ručno je manevrirana 90D oftalmološka lupa (Volk Optical Inc., Mentor, SAD) dok nije uspostavljen kut koji pruža optimalan pogled na očnu pozadinu i vaskulaturu mrežnice s glavom ON-a u središtu. Odmah nakon fotografiranja očne pozadine uslijedilo je snimanje fluoresceinske angiografije. Mišu je u dorzalnom dijelu vrata subkutano primijenjen 10%-tni fluorescein (Fluorescite 10%, Alcon) u dozi od 0,4 ml/kg. Postupak snimanja fluoresceinskog angiograma bio je isti kao i za fotografiju očne pozadine, uz dodatak pobudnog filtra (483 nm, FITC excitation filter, Edmund Optics, New Jersey, SAD) ispred izvora svjetlosti i emisijskog filtra (535 nm, FITC emission filter, Edmund Optics) ispred objektiva kamere. Po završetku snimanja ipsilateralnoga oka, postupak je ponovljen na drugom oku obrnutim redoslijedom: nakon uklanjanja oftalmičkog lubrikanta i nanošenja umjetnih suza, bez dodatne primjene fluoresceina snimljena je prvo fluoresceinska angiografija, a potom fotografija očne pozadine.

Fotografije i fluoresceinski angiogrami očne pozadine ipsilateralnog i kontralateralnog oka analizirani su prema kriteriju postojanja jasnih znakova ishemije ili edema mrežnice 1. i 3. dan nakon MCAO zahvata. Na fotografijama očne pozadine bilježena je prisutnost područja opacifikacije koja ukazuju na ishemijom uzrokovanu nekrotsku nekrozu mrežnice. Na fluoresceinskim angiogramima bilježena je prisutnost područja curenja kontrasta iz krvnih žila mrežnice kao znak propusnosti žila i aktivnog razvoja vazogenog edema. Dodatno je bilježena pojava opacifikacije rožnice i leće kao moguća komplikacija ishemije prednjeg segmenta oka. Navedeni ishodi analizirani su kao kategoričke varijable: znakovi ishemijske nekroze mrežnice (prisutni, odsutni, nedostupno analizi zbog opacifikacije rožnice/leće), znakovi aktivnog vazogenog edema (prisutni, odsutni, nedostupno analizi zbog opacifikacije rožnice/leće) te opacifikacija rožnice/leće (prisutna, odsutna).

4.6.3. Snimanje mozga i ipsilateralnog oka magnetskom rezonancijom i analiza slika

Razvoj ishemijske lezije praćen je snimanjem mozga i ipsilateralnog oka magnetskom rezonancijom (MR) pretkliničkim Bruker BioSpec 70/20 USR (Bruker BioSpin, Ettlingen, Njemačka) uređajem magnetskog polja snage 7 tesla u Tx/Rx konfiguraciji koristeći volumnu zavojnicu od 86 mm (MT0381, Bruker BioSpin) za odašiljanje (Tx) i dvoelementnu površinsku zavojnicu za mišji mozak (MT0042, Bruker BioSpin) za primanje (Rx). Mozak i ipsilateralno oko snimljeni su anatomskom T2 sekvencom te su za mozak dodatno snimljene T2 mapa i trodimenzionalna angiografija ovisna o vremenu proleta (engl. *three dimensional time of flight* - 3D-TOF).

Snimanje MR-om uslijedilo je odmah nakon fotografije i fluoresceinske angiografije očne pozadine na već uspavanim životinjama, u istim vremenskim točkama, tj. sedam dana prije te na 1. i 3. dan nakon izazivanja ishemijske ozljede. Anestezija je tijekom snimanja održavana 1,5%-tnim izofluranom u mješavini plinova 70/30% N₂/O₂. Miš je položen na trbuh na grijano postolje s njuškom unutar inhalacijske maske. Glava životinje lagano je nagnuta na desnu stranu kako bi se ipsilateralno oko približilo zavojnici i učvršćena fiksacijskim štapićima prislonjenima na hrskavicu unutarnjeg dijela uške. Na lijevo oko stavljena je kap gela s lidokainom (Cathejell Lidocaine C, Montavit, Absam, Austrija) kako bi se spriječili nasumični pokreti oka tijekom snimanja. Oba su oka dodatno zaštićena oftalmičkim lubrikantom kako bi se spriječilo isušivanje. Mišu je uz bok namješten optički senzor za praćenje disanja, a rektalno je umetnuta sonda za praćenje temperature tijela. Tijekom snimanja, tjelesna temperatura i respiratorni ciklus praćeni su sustavom za nadzor vitalnih funkcija te su podešavanjem temperature grijače podloge i anestezije održavani u rasponu od 36,5 – 37°C i 90 – 100 udisaja po minuti. Zavojnica za snimanje pozicionirana je iznad glave miša, a ostatak trupa prekriven je grijačem povezanim na ugrađeni sustav cirkulacije tople vode. Nakon pozicioniranja životinje, postolje s mišem pomaknuto je u otvor uređaja u središte radiofrekventne zavojnice.

Nadzor snimanja i upravljanje sekvencama vršilo se putem Bruker Paravision 6.1.1 programa (Bruker BioSpin). Protokol za snimanje sastojao se od pripremnih i glavnih snimaka. Pripremna snimanja uključivala su pilot snimku niske razlučivosti (Localizer_multi_slice) te TurboRARE snimku očiju u koronalnoj ravnini (LocSE_cor_Eyes) i mozga u sagitalnoj ravnini (LocSE_sag_Brain), kako bi se omogućilo precizno poravnanje virtualnih rezova. Glavna snimanja uključivala su anatomsku Turbo Spin-Echo sekvencu s visokom razlučivosti za

mozak (T2w_cor_Brain), anatomsku Turbo Spin-Echo sekvencu s visokom razlučivosti za ipsilateralno oko (T2w_leftEye_highRes), Multi-echo Spin-Echo snimku mozga sekvencijskog protokola (T2map_cor_Brain) iz koje je nakon obrade korištenjem ugrađenih makronaredbi Paravision programa izračunata T2 mapa te FLASH sekvencu (Angio_TOF_3D_MT) za snimanje 3D angiografije mozga. Parametri snimanja i geometrijske postavke svih sekvenci navedeni su u Tablici 2. Ukupno trajanje protokola snimanja iznosilo je oko 60 min.

Nakon snimanja 1. dan, odnosno 24 sata nakon MCAO zahvata, životinje bez vidljive lezije, s lakunarnim lezijama izvan područja irigacije srednje moždane arterije, s hemoragijskim krvarenjem ili ishemijskom lezijom koja prelazi u hemoragijsku leziju isključene su iz daljnjih pokusa.

Tablica 2. Protokol snimanja mozga i ipsilateralnoga oka magnetskom rezonancijom.

SEKVENCE	PARAMETRI SNIMANJA	GEOMETRIJSKE POSTAVKE
1. WOBBLE_POSITION	Vrijeme ponavljanja: 500 ms Broj usrednjavanja: 1	Veličina slike: 128 Veličina vidnog polja: 87 mm
2. Localizer_multi_slice	Vrijeme odjeka: 4 ms Vrijeme ponavljanja: 15 ms Broj usrednjavanja: 1	Orijentacija slike: koronalna, aksijalna i sagitalna Broj slika: 3 x 7 Debljina slike: 0,8 mm Rezolucija: 0,133 x 0,133 mm
3. LocSE_cor_Eyes	Vrijeme odjeka: 34 ms Vrijeme ponavljanja: 3000 ms Broj usrednjavanja: 4 Razmak odjeka: 8,5 ms	Orijentacija slike: koronalna Debljina slike: 0,35 mm Rezolucija: 0,095 x 0,095 mm
4. LocSE_sag_Brain	Vrijeme odjeka: 30 ms Vrijeme ponavljanja: 2500 ms Broj usrednjavanja: 1 Razmak odjeka: 10 ms	Orijentacija slike: sagitalna Broj slika: 3 Debljina slike: 0,7 mm Rezolucija: 0,100 x 0,100 mm

5. LocSE_leftEye	Vrijeme odjeka: 33 ms Vrijeme ponavljanja: 2500 ms Broj usrednjavanja: 8 Razmak odjeka: 11 ms	Orijentacija slike: sksijalna Broj slika: 11 Debljina slike: 0.35 mm Rezolucija: 0,095 x 0,095 mm
6. T2w_cor_Brain	Vrijeme odjeka: 33 ms Vrijeme ponavljanja: 3000 ms Broj usrednjavanja: 8 Razmak odjeka: 8,25 ms	Orijentacija slike: aksijalna Broj slika: 25 Debljina slike: 0,4 mm Rezolucija: 0,100 x 0,100 mm
7. T2w_leftEye_highRes	Vrijeme odjeka: 28 ms Vrijeme ponavljanja: 2500 ms Broj usrednjavanja: 32 Razmak odjeka: 7 ms	Orijentacija slike: aksijalna Broj slika: 9 Debljina slike: 0.4 mm Rezolucija: 0,06 x 0,06 mm
8. T2map_cor_Brain	Vrijeme odjeka: 7,5 ms Vrijeme ponavljanja: 3150 ms Broj usrednjavanja: 3 Razmak odjeka: 7,5 ms	Orijentacija slike: aksijalna Broj slika: 25 Debljina slike: 0.4 mm Rezolucija: 0,125 x 0,125 mm
9. Angio_TOF_3D_MT	Vrijeme odjeka: 2 ms Vrijeme ponavljanja: 17,238 ms Broj usrednjavanja: 4	Orijentacija slike: aksijalna Broj slika: 1 Debljina slike: 14 mm Rezolucija: 0,08 x 0,08 x 0,2 mm

Dobivene snimke i podatci prebačeni su u univerzalni format za neurološke snimke „NifTi“ pomoću besplatnog pomoćnog alata Bru2Nii (GitHub Inc., San Francisco, SAD) kako bi se pomoću konverzijskog modula „NifTi Input/Output“ mogli učitati u ImageJ (ImageJ1.53i software, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Kensington, SAD) program za analizu (214).

4.6.3.1. Volumetrijska analiza mozga miša

Na T2 snimkama mozga, u području koje odgovara velikom mozgu u anatomskom atlasu mišjeg mozga, ručnim ocrtavanjem rubova mozga i medijane linije određeni su volumeni moždanih polutki, od kojih su u kasnijem koraku oduzeti volumeni moždanih komora. U akutnoj fazi, ishemijska lezija mozga na MR snimkama vidi se kao područje moždanog tkiva hiperintenzivnog signala u odnosu na okolno zdravo tkivo. Hiperintenzivni signal posljedica je rasta vremena T2-relaksacije zbog nakupljanja vode u tom području uslijed razvoja vazogenog edema. Veličina lezije izmjerena je ručnim ocrtavanjem hiperintenzivnog područja na T2 mapi, koja daje prikaz kvantitativnog mjerenja vremena T2-relaksacije (spin-spin relaksacija) u svakom vokselu. Nakon određivanja područja ishemijske lezije, izračunat je relativni sadržaj vode određivanjem intenziteta signala edema koristeći makronaredbu koja računa prosječni intenzitet signala duž čitavog volumena lezije. Na T2 mapi izmjereni su i volumeni moždanih komora korištenjem makronaredbe koja detektira sve točke unutar polutke u kojima je izmjerena T2 vrijednost viša od najveće vrijednosti T2 zdravog tkiva ($T2 > 65$ ms). Volumen moždane komore oduzet je od volumena polutke izmjenjenog na T2 snimci kako bi se dobio volumen polutke koji obuhvaća samo moždano tkivo. Otok ozlijeđene ipsilateralne moždane polutke na prvi i treći dan nakon MCAO zahvata izražen je kao postotak povećanja volumena polutke u odnosu na volumen polutke prije izazivanja ishemije.

4.6.3.2. Analiza MR angiograma

Procjena volumena arterijske vaskulature mozga miša provedena je korištenjem angiograma dobivenih iz 3D-TOF slika generiranjem projekcija maksimalnog intenziteta (engl. *maximum intensity projections*) pomoću softvera Paravision 6.0.1., koji omogućuje vizualizaciju i inspekciju vaskulature s velikom brzinom krvnog protoka. Projekcije maksimalnog intenziteta prikazuju samo arterijsku cerebralnu vaskulaturu budući da je venski signal potisnut zbog niske brzine protoka krvi. Volumen arterijske vaskulature za svaku hemisferu analiziran je u kuboidnom 3D području od interesa (engl. *region of interest* – ROI) koje zauzima ventralnu polovicu 3D vidnog polja, mjereći pritom volumen glavnih moždanih i vratnih arterija. Volumen i položaj ROI-ja standardizirani su korištenjem anatomskih orijentira na prednjem, stražnjem i gornjem dijelu ROI-ja. Ekstrahirani ROI korišten je za daljnju analizu. Segmentacija je izvedena korištenjem algoritma otvorenog izvora za strojno učenje u FIJI/ImageJ-v.1.53c programu kako bi se stvorila optimizirana skripta za dobivanje

parametara volumena i gustoće vaskulature. Nakon određivanja pragova detekcije i binarizacije slika, na dobivenoj konačnoj slici objekata izvršena je volumetrijska analiza koja je izražena kao volumen vaskulature ipsilateralne ili kontralateralne hemisfere u mm³.

4.6.3.3. Volumetrijska analiza mrežnice

Debljina mrežnice izmjerena je na jednom T2-ponderiranom središnjem sagitalnom rezu postavljenom kroz središte oka i izlazište ON-a, u tri točke iznad i tri točke ispod izlazišta ON-a. Segmentacija mrežnice izvedena je subpikslnom točnošću na linearno interpoliranim poduzorkovanim T2-ponderiranim slikama, dodatno izglađenima anizotropno difuzijskim dvodimenzionalnim filtrom (engl. *anisotropic diffusion 2D filter*). Točne pozicije mjerenja određene su nakon definiranja središta očne jabučice i ravnomjerne distribucije projekcija okomitih na mrežnicu. Debljina mrežnice izražena je u mm.

4.7. Određivanje izražaja bradikininskih receptora u mišjem mozgu i stanicama mikroglije mozga i mrežnice prije i nakon izazivanja ishemije

4.7.1. Perfuzijska fiksacija, izolacija i priprema tkiva za imunohistokemijsku analizu

U svakoj vremenskoj točki po 3 miša iz skupine podvrgnuta su perfuzijskoj fiksaciji te izolaciji mozga i očiju za imunohistokemijsku analizu. Miš je uspavan i.p. primjenom 2,5%-tnog tribrometanola (Avertin, Sigma-Aldrich) u dozi 250 mg/kg. Za provjeru miorelaksacije životinje izveden je test pedalnog refleksa (eng. *pedal withdrawal reflex*) pritiskanjem kože među prstima prednje ili stražnje šape, te promatranjem povlači li ili trza anestetizirana životinja šapu.

Uspavani miš položen je na leđa te su mu imobilizirani prednji udovi. U predjelu donjeg abdomena napravljen je vertikalni rez kroz kožu i mišićni sloj. Zatim je prerezan ošit, a potom i rebra, pazeći da se pritom ne oštete jetra, pluća ili srce. Pridržavajući prsnu kost pincetama, otvoren je prsni koš te oslobođen pristup srcu. U lijevu klijetku uvedena je 25G intravenozna kanila (KD-Fly, KDM, Czechowice-Dziedzice, Poljska) spojena na špricu ispunjenu s 30 ml fiziološke otopine s fosfatnim puferom (engl. *phosphate buffered saline* – PBS) sobne temperature sljedećeg sastava: 13,7 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,65 mM Na₂HPO₄, 0,14 mM

KH_2PO_4 (Kemika), a desna pretkljetka je prerezana škaricama kako bi se omogućilo ispiranje krvi iz krvožilnog sustava. PBS se lagano potiskivao kroz srce (oko 10 ml/min) sve dok jetra i pluća nisu sasvim izbljedia, predstavljajući znak ispravno odrađene perfuzije. Kroz istu rupicu u lijevoj klijetci miš je zatim transkardijalno perfuzijski fiksiran s 30 ml 4%-tne otopine paraformaldehida (engl. *paraformaldehyde* – PFA) (Biognost, Zagreb, Hrvatska) u PBS-u.

Odmah po transkardijalnoj perfuzijskoj fiksaciji uslijedila je izolacija očiju i mozga. Za enukleaciju mišjih očiju prvo je škaricama proširen vjeđni rasporak, odstranjene su suzne žlijezde i potom je oko podignuto pincetom zakrivljenog vrha (Dummont #7, F.S.T.) kako bi se prerezao ON i enukleirala očna jabučica. Pod operacijskim mikroskopom Olympus SZ-STU2 (Olympus) uklonjene su rožnica i leća kružnim rezom u području limbusa. E nukleirane očne jabučice bez staklovine, leće i rožnice uronjene su u 4%-tnu otopinu PFA u PBS-u na sat vremena na sobnoj temperaturi radi postfiksacije prožimanjem.

Za izolaciju mozga, miš je prvo dekapitiran, a potom su škaricama i pincetom pažljivo prerezane i odstranjene koža i lubanja. Mozak je izoliran pazeći pritom da se pincetom ravnog vrha (Dummont #5, F.S.T.) pažljivo odstrane moždane ovojnice kako se ne bi oštetile nježne moždane strukture. Odmah po izolaciji, mozak je uronjen u 4%-tnu otopinu PFA u PBS-u i držan u istoj otopini 48 sati na 4°C radi postfiksacije prožimanjem.

Nakon postfiksacije, oči i mozak isprani su PBS-om te prebačeni u 10%-tnu otopinu saharoze (Sigma-Aldrich) u PBS-u kako bi se započeo proces dehidracije i krioprezervacije. Nakon 24 sata na 4°C u 10%-tnoj otopini (čeka se da tkivo potone, kao znak prožimanja) mozak i oči prebačeni su u 30%-tnu otopinu saharoze u PBS-u na 72 sata (do potonuća tkiva) na 4°C. Prije smrzavanja, mozak i oči izvađeni su iz saharoze, kratko posušeni papirnatim filter papirom kako bi se odstranio višak otopine te pažljivo uronjeni u aluminijsku kadnicu s ljepljivom za tkivo Tissue Tek (O.C.T. Compound, Sakura, Torrance, SAD). Uklopljena tkiva su prvo 5 minuta smrznuta na -80°C te su do daljnje obrade pohranjena u zamrzivaču na -20°C.

4.7.2. Imunohistokemijsko obilježavanje fluorescentnim protutijelima

Smrznuti blokovi uklopljenih tkiva rezani su na kriostatu Leica CM3050 S (Leica, Wetzlar, Njemačka) na temperaturi od -22°C. Poprečni ili frontalni rezovi mozga debljine 25 µm, te sagitalni rezovi očiju u području izlazišta ON-a debljine 30 µm postavljeni su na pozitivno nabijena stakalca Superfrost Plus (Adhesion Microscope Slides, Eprexia, Kalamazoo, SAD) koja su potom pohranjena u zamrzivaču na -20°C.

U svrhu određivanja izražaja bradikininskih receptora u mozgu prije i nakon izazivanja ishemije te kako bi ustvrdili izražavaju li stanice mikroglije mozga i mrežnice bradikininske receptore, rezovi su obilježeni kombinacijom protutijela na ioniziranu kalcij-vezujuću adaptorsku molekulu 1 (engl. *ionized calcium binding adaptor molecule 1* – Iba-1), koja se koristi kao biljeg mikroglije, i protutijela na B1R ili B2R.

Isti postupak imunohistokemijskog označavanja korišten je za rezove mozga i očiju. Smrznut rezovi prvo su inkubirana na sobnoj temperaturi preko noći, a onda još barem sat vremena u eksikatoru (Kartell Labware, Noviglio, Italija) kako bi se osiguralo čvrsto prijanjanje rezova tkiva uz stakalca te spriječilo njihovo odvajanje tijekom postupka. Rezovi su isprani 4 puta po 5 minuta PBS-om kako bi se uklonili mogući ostaci ljepila za tkivo i potom inkubirani 60 minuta na sobnoj temperaturi u otopini 0,25%-tnog Tritona-X (Sigma-Aldrich) i 10%-tnog magarećeg seruma (Sigma-Aldrich) u PBS-u. Nakon blokiranja, rezovi su preko noći na sobnoj temperaturi inkubirani u smjesi primarnih protutijela razrijeđenih u otopini 0,1%-tnog Tritona-X i 1%-tnog magarećeg seruma u PBS-u. Idući dan, stakalca su isprana 4 puta po 5 minuta otopinom 0,1%-tnog Tritona-X u PBS-u, a zatim inkubirana 2 sata u mraku na sobnoj temperaturi s fluorescentno obilježenim sekundarnim protutijelima razrijeđenima u PBS-u. Po završetku inkubacije višak sekundarnih protutijela uklonjen je ispiranjem 4 puta po 5 minuta PBS-om. Primarna i sekundarna protutijela te njihova razrjeđenja navedena su u Tablici 3. Rezovi su potom 3 minute inkubirani u otopini 4',6-diamidino-2-fenilindola (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole* - DAPI) u PBS-u razrjeđenja 1:2000 (10 mM, Abcam, Cambridge, UK), fluorescentnoj boji koja neselektivno boji jezgre stanica, te su zatim isprani destiliranom vodom i PBS-om po 30 s te naposljetku prekriveni medijem za pokrivanje i očuvanje fluorescencije (Fluorescence Mounting Medium, Dako S3023, Agilent, Santa Clara, SAD) i pokrovnim staklom (Biognost). Stakalca s uzorcima ostavljena su u mraku preko noći kako bi se medij za pokrivanje osušio, a sljedeći dan su očišćena i pohranjena na -4°C.

Tablica 3. Popis primarnih i sekundarnih protutijela te njihovih razrjeđenja korištenih u imunohistokemijskoj analizi.

PRIMARNA PROTUTIJELO					
Protutijelo	Porijeklo	Monoklonalno/ poliklonalno	Razrjeđenje	Tvrtka	Kataloški broj
Anti – Iba-1	Koza	poliklonalno	1:200	Novus Biologicals	NB100-1028
Anti – B1R	Zec	poliklonalno	1:200	Bioss Antibodies	bs-8675R
Anti – B2R	Zec	poliklonalno	1:100	Bioss Antibodies	bs-2422R
SEKUNDARNA PROTUTIJELO					
Protutijelo	Porijeklo	Monoklonalno/ poliklonalno	Razrjeđenje	Tvrtka	Kataloški broj
Alexa Fluor 488	Magarac anti - zec	-	1:500	Abcam	ab150073
Alexa Fluor 546	Magarac anti - koza	-	1:500	Thermo Fisher Scientific	A-11056

4.7.3. Snimanje imunohistokemijski obilježenog tkiva konfokalnim mikroskopom i analiza slika

Obilježeni rezovi mozga i mrežnice snimljeni su konfokalnim mikroskopom Olympus FLUOVIEW FV3000 uz pripadajući FV31-SW Fluoview softver (Olympus).

Kako bi se analizirao ukupni izražaj bradikinskih receptora u moždanom tkivu, na svakom je rezu odabrano 6 ROI-a, tri u području lezije i tri u perilezijskom području, te odgovarajuća područja na mozgovima prije izazivanja ishemije. Za snimanje B1R ili B2R pozitivnih stanica, svaki ROI je snimljen korištenjem 40x objektiva (UplanSApo, NA 0.95, Olympus), uz razlučivost 2048 x 2048, laserskom zrakom od 488 nm, snage lasera = 0,5% atenuacije voltaže (engl. *high voltage* – HV) = 500 te emisijskog spektra od 500 – 600 nm. Svi parametri snimanja ostali su isti između različitih regija i rezova istog bojenja. Intenzitet

signala na slikama moždanih rezova ($n = 3$ /skupini/području/vremenskoj točki) procijenjen je pomoću ImageJ programa, na način da je mjerena integrirana optička gustoća signala, koja odražava vrijednost intenziteta fluorescencije po jedinici površine, nakon oduzimanja vrijednosti pozadine koristeći algoritam kotrljajuće kuglice (eng. *rolling ball algorithm*) (215). Vrijednosti mjerenja izražene su u arbitrarnim jedinicama.

Kako bi se odredilo izražava li mikroglija mozga bradikininske receptore, slike snimljene konfokalnim mikroskopom analizirane su radi potvrde preklapanja/ kolokalizacije fluorescentnih signala. Slike su snimljene korištenjem 60x imerzijskog objektiva (PlanApo N, NA 1.4, Olympus) uz razlučivost 1024 x 1024. Za snimanje B1R ili B2R pozitivnih stanica korištena je laserska zraka od 488 nm, snage lasera 0,5%, HV = 500, emisijski spektar od 500 – 600 nm, a za snimanje Iba1 pozitivnih stanica laserska zraka od 546 nm, snage lasera = 1,5%, HV = 500, emisijski spektar 570 – 670 nm. Svi parametri snimanja ostali su isti između različitih regija i rezova istog bojenja. Kolokalizacija fluorescentnih signala smatrala se potvrdom prisutnosti bradikininskih receptora na staničnoj membrani mikroglije.

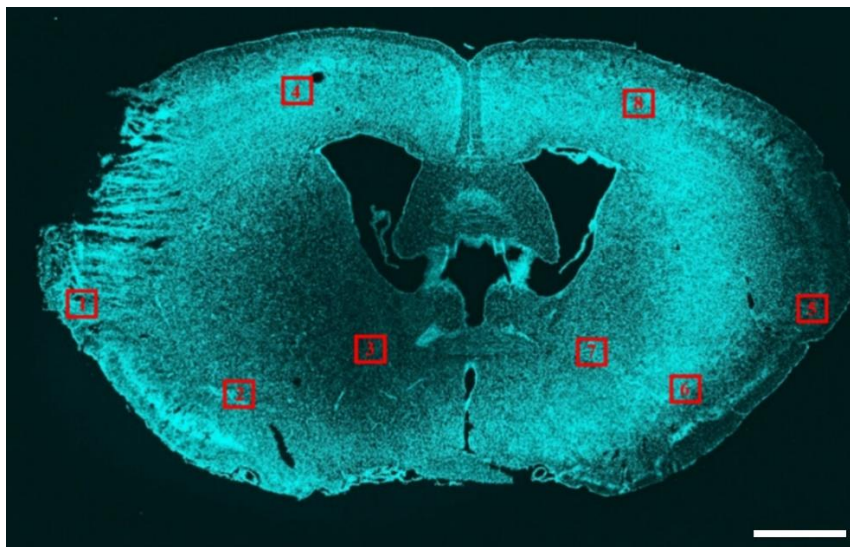
Kako bi se odredilo izražava li mikroglija mrežnice bradikininske receptore, slike snimljene konfokalnim mikroskopom analizirane su radi potvrde preklapanja/ kolokalizacije fluorescentnih signala. Slike su snimljene korištenjem 60x imerzijskog objektiva (PlanApo N, NA 1.4, Olympus) uz razlučivost 512 x 512. Za snimanje B1R ili B2R pozitivnih stanica korištena je laserska zraka od 488 nm, snage lasera 0,3%, HV = 500, emisijski spektar od 500 – 600 nm, a za snimanje Iba1 pozitivnih stanica laserska zraka od 546 nm, snage lasera 1,5%, HV = 500, emisijski spektar 570 – 670 nm. Svi parametri snimanja ostali su isti između različitih regija i rezova istog bojenja. Kolokalizacija fluorescentnih signala smatrala se potvrdom prisutnosti bradikininskih receptora na staničnoj membrani mikroglije.

4.8. Automatska analiza brojnosti i aktivacije stanica mikroglije prije i nakon izazivanja ishemijskog oštećenja mozga

Od svake životinje žrtvovane za imunohistokemijsku analizu ($n = 3$ /skupini/vremenskoj točki) odvojena su 3 reza mozga debljine 25 μ m unutar regije +0,02 do -0,28 mm od bregme, koja su potom imunohistokemijski obilježena anti-Iba1 primarnim protutijelom (razrjeđenje 1:200, Goat anti-Iba-1, NB100-1028, Novus Biologicals, Centennial, SAD) te Alexa Fluor 488 sekundarnim protutijelom (razrjeđenje 1:500, Donkey Anti-Goat

Alexa Fluor® 488, ab150129, Abcam) prema protokolu opisanom u odjeljku 3.8.2. Obilježeni rezovi snimljeni su konfokalnim mikroskopom Olympus FLUOVIEW FV3000 uz pripadajući FV31-SW Fluoview softver (Olympus) te je na dobivenim slikama provedena automatska analiza brojnosti i trodimenzionalne morfologije stanica mikroglije.

Za svaki rez napravljena je virtualna mapa čitavog reza mozga 4x objektivom (UplanSApo, NA 0.16, Olympus) korištenjem laserske zrake od 405 nm za vizualizaciju DAPI bojenja. Nakon toga, odabrana su 4 ROI-ja na ozlijeđenoj, ipsilateralnoj strani mozga i 4 odgovarajuća ROI-ja na neozlijeđenoj, kontralateralnoj strani mozga. Odabrana su sljedeća područja: 1) područje lezije kore ipsilateralne moždane polutke (engl. *ipsilateral hemisphere* – ILH), 2) područje lezije strijatuma ILH, 3) perilezijsko područje strijatuma ILH, 4) perilezijsko područje kore ILH, 5) područje lezije kore kontralateralne moždane polutke (engl. *contralateral hemisphere* - CLH), 6) područje lezije strijatuma CLH, 7) perilezijsko područje strijatuma CLH, 8) perilezijsko područje kore CLH, prema prikazu na Slici 6.



Slika 6. Reprezentativna slika mape reza mozga prikazuje odabrana područja od interesa (crveni kvadrati označeni brojevima), u kojima su potom pri većem povećanju snimljene Iba-1 pozitivne stanice mikroglije. Povećanje 4x. Mjerna oznaka: 1 cm.

Za snimanje Iba-1 pozitivnih stanica, svaki ROI je snimljen kao stog slika u z osi, tj. z-stog (engl. *z-stack*), kroz čitavu debljinu reza (veličina koraka = 0,31 μm) korištenjem 60x imerzijskog objektiv (UplanSApo, NA 1.4, Olympus) i laserske zrake od 488 nm, snage lasera = 1,2%, HV = 475, emisijski spektar 500 – 550 nm uz razlučivost 1024 x 1024. Svi parametri

snimanja ostali su isti između različitih regija i rezova istog bojenja. Korištenjem softvera za obradu slika CellSens (Olympus), sve su slike dekonvoluirane korištenjem ograničenog iterativnog protokola, naprednog algoritma maksimalne vjerojatnosti za po 3 iteracije i primjenom smanjenja šuma, adaptivne funkcije rasapa točke (engl. *point spread function*) i uklanjanja pozadine. Prije analize, svi z-stogovi slika dodatno su obrađeni u softveru ImageJ/Fiji, korištenjem skupnog načina rada za primjenu sljedećih makronaredbi: Radijus “Ukloni izvanredne vrijednosti” = 2, prag = 3; Radijus kotrljajuće kuglice „Oduzmi pozadinu“ = 1, klizni paraboloid je uključen.

Za trodimenzionalnu morfološku analizu stanica mikroglije prilagođena je prethodno objavljena skripta temeljena na MATLAB-u (MATLAB, MathWorks, Portola Valley, SAD) pod nazivom 3Dmorph (216). Ova skripta automatski pronalazi cijele stanice, povezujući stanične nastavke u svim smjerovima, nakon početnog unosa očekivane vrijednosti te gornjeg i donjeg praga veličine stanice koji je određen na testnim rezovima mozga prije i nakon izazivanja ishemije. Daljnje serije datoteka obrađuju se bez korisničkog unosa. Korišteni su sljedeći parametri: prag slike = 0,1 i prag šuma = 1000. Za svaku sliku u svim područjima analiziran je broj stanica mikroglije kao parametar migracije i proliferacije te je za svaku pojedinačnu stanicu mikroglije određen indeks ramifikacije. Indeks ramifikacije predstavlja omjer teritorijalnog volumena i volumena stanice, a služi kao mjera razgranatosti stanice (216). Smanjenje indeksa ramifikacije ukazuje da je u stanici došlo do skraćivanja ili potpunog povlačenja nastavaka uz istovremeno povećanje volumena same. S obzirom da mikroglija prilikom aktivacije prelazi iz razgranatog prema ameboidnom obliku, indeks ramifikacije je uzet kao parametar aktivacijskog statusa stanice.

4.9. Određivanje genskog izražaja bradikininskih receptora u mišjem mozgu i mrežnici prije i nakon ishemije

4.9.1. Žrtvovanje životinja i priprema tkiva za izolaciju ukupne RNA

U svakoj vremenskoj točki, 3 miša po skupini žrtvovana su za izolaciju ukupne ribonukleinske kiseline (engl. *ribonucleic acid* – RNA) iz mozga i očiju. Za žrtvovanje miševa i izolaciju tkiva korišten je modificirani protokol opisan u odlomku 3.8.1. Kako bi se osigurala maksimalna čistoća i kvaliteta uzoraka, svi navedeni postupci provedeni su steriliziranim

priborom i otopinama. Ukratko, miš je uspavan i.p. primjenom 2,5%-tnog tribrometanola (Avertin, Sigma-Aldrich) u dozi 250 mg/kg te je proveden test pedalnog refleksa. Miš je imobiliziran, izveden je rez u području abdomena i oslobođen pristup srcu rezovima kroz ošit i rebra. U lijevu klijetku uvedena je 25G intravenozna kanila (KD-Fly, KDM) spojena na špricu ispunjenu s 30 ml otopine PBS-a sobne temperature te je prerezana desna pretklijetka kako bi se omogućilo ispiranje krvi iz krvožilnog sustava. Budući da je za izolaciju RNA potrebno svježije tkivo, mozak i očne jabučice izolirani su odmah po perfuziji PBS-om. Mozak je izoliran po dekapitaciji, odstranjivanju kože, lubanje i moždanih ovojnica. Izolirani mozak brzo je premješten u sterilnu Petrijevu zdjelicu s PBS-om na ledu, gdje su žiletom odvojene lijeva i desna moždana polutka te uklonjeni olfaktorni bulbusi i mali mozak. Moždane polutke odvojene su u prethodno označene, izvagane i ohlađene tubice od 2 ml u koje je dodano 125 µl smjese inhibitora proteaza (cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Basel, Švicarska). Za pripremu otopine inhibitora proteaza jedna tableta inhibitora otopljena je u 1,5 ml sterilne vode tretirane dietil-pirokarbonatom (DEPC voda, Sigma-Aldrich). Tubice s tkivom opet su izvagane kako bi se mogla izračunati masa izoliranog tkiva i potom brzo zamrznute u tekućem dušiku te pohranjene na -20°C do daljnje obrade.

Očne jabučice enukleirane su brzim i snažim vađenjem oka obuhvaćanjem očne jabučice u području ON-a pincetama zakrivljenog i tupog vrha Dummont #7 (F.S.T.). E nukleirane su oči prvo odvojene u sterilne Petrijeve zdjelice s PBS-om na ledu te je pod operacijskim mikroskopom (Olympus SZ-STU2, Olympus) napravljen kružni rez u području limbusa, odstranjene rožnica i leća te pažljivo odvojena mrežnica od ostatka tkiva pincetama Dummont #5 (F.S.T.). Izolirane mrežnice prebačene su u prethodno označene, izvagane i ohlađene tubice od 2 ml u koje je dodano 60 µl otopine inhibitora proteinaza. Tubice s tkivom su zatim izvagane kako bi se mogla izračunati masa izoliranog tkiva i potom brzo zamrznute u tekućem dušiku te pohranjene na -20°C do daljnje obrade.

4.9.2. Izolacija ukupne RNA iz mišjeg mozga i mrežnice

U tubice s izoliranim tkivom u otopini inhibitora proteaza dodana je otopina za izolaciju RNA (TRIzol reagens, Invitrogen, Waltham, SAD), po 1 ml za moždane polutke i 500 µl za mrežnice. Tkiva su homogenizirana sonifikacijom (jačina = 4, pulsevi od 10 s) koristeći Q125 sonifikator (Qsonica, Newtown, SAD). Homogenatima moždanih polutki dodano je 200 µl, a homogenatima mrežnica 100 µl kloroforma (Kemika), nakon čega je sadržaj promiješan 20 s

na vrtložnoj miješalici. Kako bi se razdvojile faze, tubice su zatim inkubirane 5 minuta na sobnoj temperaturi i potom centrifugirane na 14000 g kroz 15 minuta na 4°C koristeći Universal 320R centrifugu (Hettich, Westphalia, Njemačka). Gornja bezbojna faza u kojoj se nalazi RNA pažljivo je prebačena u novu tubicu te je na nju dodan izopropanol, 500 µl u uzorke moždanih polutki i 250 µl u uzorke mrežnica. Tubice su inkubirane 8 minuta na sobnoj temperaturi i potom centrifugirane na 12000 g kroz 8 minuta na 4°C kako bi se precipitirala RNA. Supernatant je bačen, talog percipitirane RNA moždanih polutki ispran s 1 ml, a talog RNA iz mrežnica ispran s 500 µl 75%-tnog etanola u DEPC vodi. Nakon centrifuge od 7500 g kroz 5 minuta na 4°C, maknut je supernatant te je talog RNA moždanih polutki otopljen u 200 µl, a mrežnica u 100 µl DEPC vode. Otopljeni uzorci RNA pohranjeni su na -80°C.

4.9.3. Sinteza cDNA iz ukupne RNA mišjeg mozga i mrežnice reverznom transkripcijom

Čistoća i koncentracija izolirane RNA provjerena je UV-VIS spektrofotometrom za mjerenje malih uzoraka NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, SAD). Prije mjerenja uzorci su proveli sat vremena na ledu kako bi se u potpunosti otopili.

Za sintezu komplementarne DNA (engl. *complementary deoxyribonucleic acid* – cDNA), u 1 µg izolirane RNA dodano je 2 µl početnica Oligo (dT)18-Primer (1 µg/µl, Promega) i DEPC voda do ukupnog volumena od 16 µl. Dobivena reakcijska smjesa inkubirana je 5 minuta na 70°C i 5 minuta na 4°C u uređaju za lančanu reakciju polimerazom 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). U smjesu je potom dodano još 5 µl reakcijskog pufera M-MLV RT (5x, Promega), 0,5 µl smjese nukleotida dNTP Mix (10mM, Promega), 1 µl reverzne transkriptaze RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl, Promega) i 2,5 µl DEPC vode.

Završni volumen reakcijske smjese iznosio je 25 µl, a sinteza cDNA provedena je inkubacijom 10 minuta na 40°C, 50 minuta na 47°C i 15 minuta na 70°C u PCR uređaju 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem). cDNA je pohranjena na -20°C do daljnje obrade.

4.9.4. Određivanje relativnog izražaja mRNA bradikininskih receptora u mišjem mozgu i mrežnicama nakon ishemije kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom (qPCR)

Relativni izražaj glasničke RNA (engl. *messenger ribonucleic acid* – mRNA) bradikininskih receptora određen je zasebno u ozlijeđenoj ipsilateralnoj i neozlijeđenoj kontralateralnoj moždanoj polutci te u ipsilateralnoj i kontralateralnoj mrežnici metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (engl. *quantitative polymerase chain reaction* – qPCR). Za to je korištena komercijalna smjesa reagensa TaqMan® Gene Expression kit (Applied Biosystems) te komercijalno dostupne početnice i pripadajuće TaqMan® probe. Prema uputama proizvođača, reakcijska smjesa za svaki uzorak sadržavala je 1 µl cDNA, 1 µl smjese početnica i TaqMan® proba, 8 µl DEPC vode te 10 µl TaqMan® smjese. Svaki uzorak analiziran je u triplikatu na pločici s 96 jažica (FG-TCII Reaction Plt-96 Well, 4306737, Invitrogen). Na svaku pločicu uključene su i negativne kontrole za svaki analizirani gen koje sadrže 1 µl odgovarajuće smjese početnica i TaqMan® proba, 8 µl DEPC vode te 10 µl TaqMan® smjese. Osim gena za bradikininski receptor tipa 1 i tipa 2, analiziran je i izražaj gena održavanja stanice za malu ribosomsku podjedinicu 18S i hipoksantin–gvanin fosforibozil transferazu (engl. *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*), prema kojima se kasnije provela normalizacija dobivenih podataka. Popis analiziranih gena i njihovih početnica nalazi se u Tablici 4. qPCR je proveden pomoću uređaja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) prema programu: 2 minute na 50°C, 10 minuta na 95°C (aktivacija) te 40 ciklusa inkubacije 15 s na 95°C (denaturacija) i 1 minutu na 60°C (amplifikacija). Relativni izražaj mRNA bradikininskih receptora je procijenjen na temelju jednadžbe:

$$R = 2^{-[Ct \text{ gena od interesa} - Ct \text{ konstitutivno izraženog gena]} = 2^{-\Delta Ct}$$

U jednadžbi se relativni izražaj mRNA gena od interesa (R) mjeri kao: 2 (pod pretpostavkom 100% učinkovitih reakcija) podignut na potenciju negativne razlike Ct vrijednosti gena od interesa i srednje Ct vrijednosti konstitutivno izraženih gena (ΔCt).

Tablica 4. Popis početnica korištenih za qPCR analizu.

GEN	ŠIFRA POČETNICE	BOJA	TVRTKA
B1R	Mm04207315_s1	FAM-MGB	Applied Biosystems
B2R	Mm00437788_s1	FAM-MGB	Applied Biosystems
18S rRNA	Mm04277571_s1	FAM-MGB	Applied Biosystems
HPRT	Mm03024075_m1	FAM-MGB	Applied Biosystems

4.10. Statistička analiza podataka

Na temelju naših preliminarnih podataka, analizom snage provedenom pomoću softvera G*Power (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Njemačka) dvostranim Mann-Whitneyjevim U-testom uz snagu = 0,8 i $\alpha = 0,05$, procijenjeno je da će za otkrivanje razlike u volumenu moždane lezije biti potrebno 6 životinja po genotipu po vremenskoj točki. Međutim, predviđajući osipanje uzorka zbog očekivane stope smrtnosti do 30%, veličina uzorka je povećana na 9 životinja po genotipu ($N_{\text{ispravljeno}} = N / (1 - [\% \text{ osipanja uzorka} / 100])$) za vremenske točke nakon MCAO zahvata.

Statistička analiza provedena je pomoću Graph Pad Prism (GraphPad Software, San Diego, SAD) softvera. Analiza preživljenja provedena je izračunavanjem udjela preživljenja korištenjem Kaplan-Meierove metode.

Nakon potvrde normalnosti distribucije podataka pomoću Shapiro-Wilkovog testa, za procjenu bazalne glukoze i glukoze natašte, HbA1c, tjelesne mase, volumena arterijske vaskulature, volumena ishemijske lezije, volumena normalizirane ipsilateralne i kontralateralne moždane polutke, otoka ipsilateralne moždane polutke, relativne količine vode, neurološkog deficita i prosječne debljine mrežnice korišten je mješoviti model dvosmjernje analize varijance (engl. *analysis of variance* - ANOVA) s vremenom i genotipom kao varijablama. *Post hoc* usporedbe između genotipova provedene su pomoću Tukeyjevog testa višestrukih usporedbi, dok je za usporedbe unutar genotipa korišten Šidakov *post hoc* test. Za procjenu sistoličkog tlaka, dijastoličkog tlaka, srednjeg arterijskog tlaka, intaokularnog tlaka, izražaja *Bdkrb1* i *Bdkrb2* gena, izražaja B1R i B2R proteina, brojnosti stanica mikroglije te aktivacijskog statusa stanica mikroglije korišten je mješoviti ANOVA model s vremenom i genotipom kao varijablama uz korekciju za višestruke usporedbe kontrolirajući stopu lažnog otkrivanja uz α od 0,05. Za procjenu statusa perfuzije srednje moždane arterije korišten je jednostruki ANOVA test s Tukeyjevim *post hoc* testom višestrukih usporedbi. Statistička

značajnost definirana je kao $P < 0,05$. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna pogreška ili medijan s interkvartilnim rasponom.

5. REZULTATI

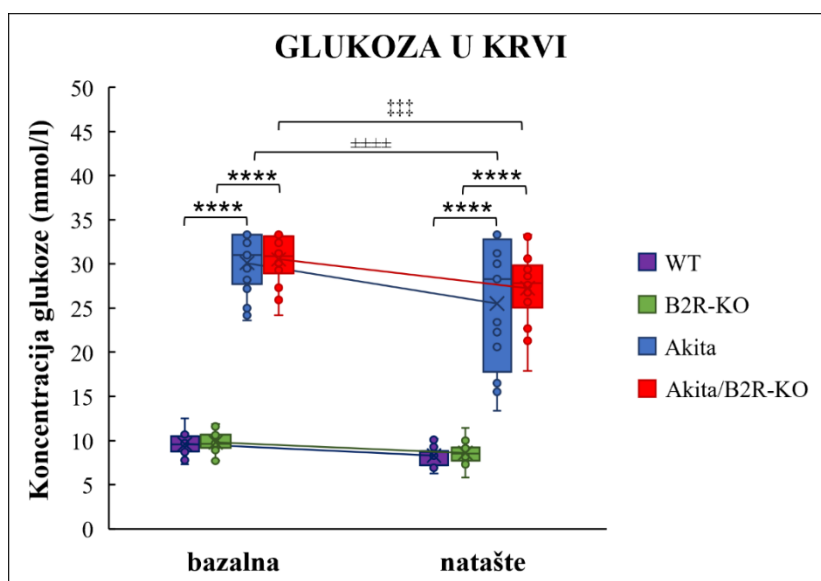
5.1. Određivanje mišjeg genotipa

Ukupno 96 mužjaka ($n = 24$ po skupini) sojeva Akita, Akita/B2R-KO, B2R-KO i WT korišteno je u pokusima. U svrhu potvrde genotipa svim miševima je izolirana DNA iz uzoraka vrška repa prikupljenih prije ulaska u pokus te ponovno po završetku pokusa.

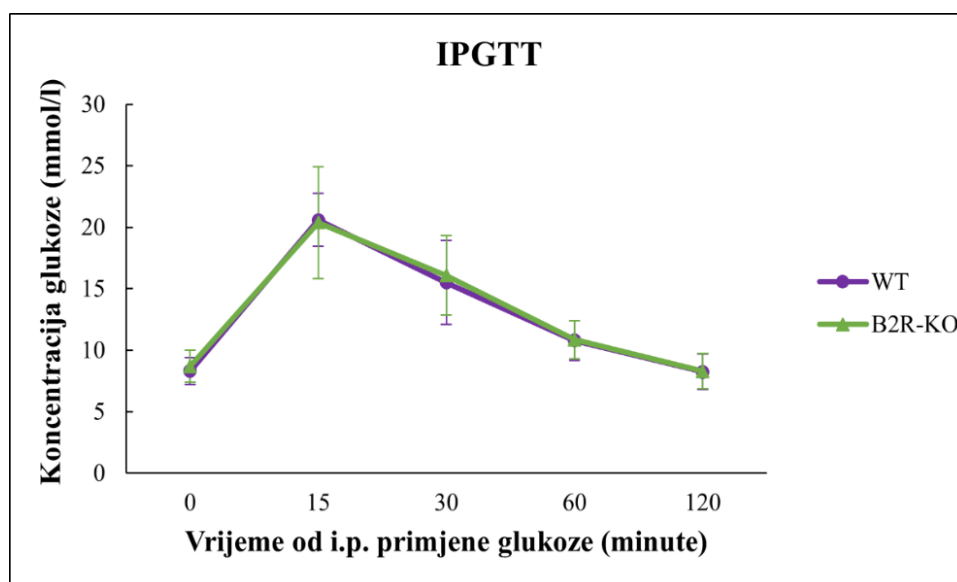
5.2. Šećerna bolest i nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 utječu na glikemijski status i tjelesnu masu

S obzirom na to da je u istraživanju korišten mišji model dijabetesa tipa 1, odnosno da su korišteni miševi heterozigotni za mutaciju *Ins2* gena koji spontano razvijaju dijabetes u razdoblju od 3 do 4 tjedna nakon rođenja, ali i miševi bez funkcionalnog B2R-a, za koji se smatra da bi mogao sudjelovati u regulaciji metabolizma glukoze, prije ulaska u pokus svim životinjama određen je glikemijski status, kao i utjecaj istoga na tjelesnu masu.

Mjerenjem bazalne glukoze utvrđena je hiperglikemija kod dijabetičnih Akita i Akita/B2R-KO miševa te normoglikemija kod B2R-KO i WT miševa (Akita naspram WT, $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,0001$) (Slika 7). Nakon 6 sati gladovanja, razina glukoze u krvi se kod dijabetičnih Akita ($P < 0,0001$) i Akita/B2R-KO ($P < 0,001$) miševa značajno smanjila; ali je i dalje bila značajno povišena u odnosu na koncentracije izmjerene kod WT i B2R-KO miševa (Akita naspram WT, $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,0001$) (Slika 7). Nedostatak B2R-a nije utjecao na glikemijski status životinja bez šećerne bolesti, imali su normalnu razinu glikemije prije i nakon gladovanja. Također nije bilo razlike u metabolizmu glukoze među nedijabetičkim životinjama, što je vidljivo iz rezultata IPGTT-a koji pokazuje da se koncentracije glukoze u krvi i njene promjene u mjerenim vremenskim točkama nisu razlikovale između WT i B2R-KO miševa (Slika 8). U obje skupine, najviša koncentracija glukoze u krvi izmjerena je 15 minuta od i.p. injekcije glukoze nakon čega je uslijedio postupan pad i konačno povratak na početnu koncentraciju 120 minuta od primjene glukoze. Dijabetični miševi nisu podvrgnuti IPGTT-u zbog rizika razvoja hiperglikemijske kome i smrtnog ishoda.

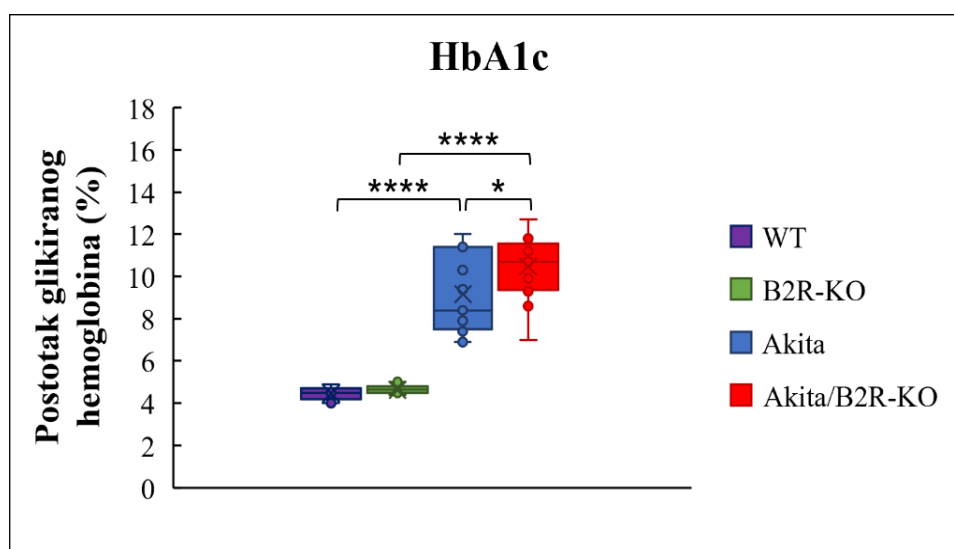


Slika 7. Šećerna bolest povisuje koncentraciju bazalne glukoze i glukoze natašte u krvi. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći mješoviti model ANOVA s Tukeyjevim *post hoc* testom: (****) $P < 0,0001$. Statistički značajne razlike unutar genotipa, koristeći mješoviti model ANOVA sa Šidakovim *post hoc* testom: Akita/B2R-KO (††††) $P < 0,001$; Akita (†††††) $P < 0,0001$. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, $n = 18$; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, $n = 18$; Akita, dijabetični miševi, $n = 17$; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, $n = 18$.



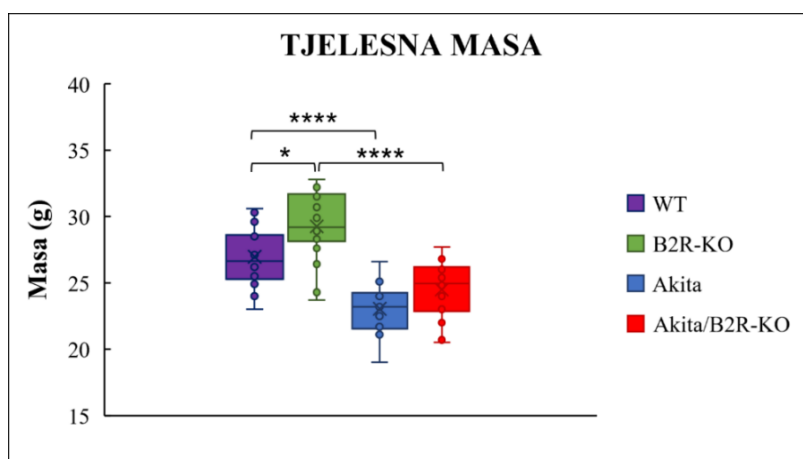
Slika 8. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 kod nedijabetičkih miševa ne utječe na koncentraciju glukoze u krvi izmjerenu tijekom intraperitonealnog testa tolerancije na glukozu (IPGTT). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, $n = 18$; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, $n = 18$.

Značajno veći postotak glikiranog hemoglobina (HbA1C) u krvi Akita i Akita/B2R-KO miševa naspram njihovih zdravih kontrola potvrda je kronične hiperglikemije u dijabetičnih životinja (Akita naspram WT, $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,0001$). Uz to, pokazano je da kod dijabetičnih životinja nedostatak B2R-a uzrokuje značajan porast u postotku glikoziliranog hemoglobina, ukazujući na dugoročno lošiji glikemijski status u usporedbi s dijabetičnim Akita miševima bez genske preinake (Akita naspram Akita/B2R-KO, $P < 0,05$) (Slika 9).



Slika 9. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 povećava razinu glikiranog hemoglobina (HbA1c) u krvi dijabetičnih životinja. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći jednosmjerni ANOVA test s Tukeyjevim *post hoc* testom: (*) $P < 0,05$; (****) $P < 0,0001$. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, $n = 18$; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, $n = 18$; Akita, dijabetični miševi, $n = 17$; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, $n = 17$.

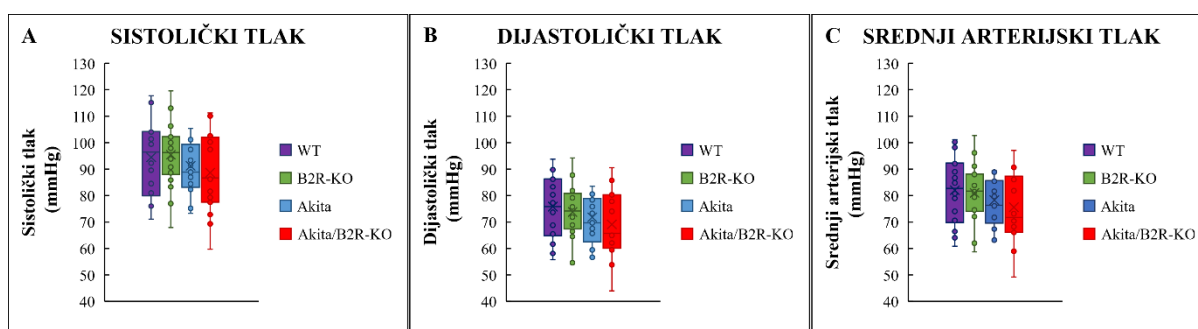
Dijabetični Akita i Akita/B2R-KO miševi imali su značajno nižu tjelesnu masu od njihovih kontrola (Akita naspram WT, $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,0001$) (Slika 10). Nedostatak B2R-a kod dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa nije utjecao na tjelesnu masu, međutim kod miševa bez šećerne bolesti je nedostatak B2R-a uzrokovao značajno povećanje tjelesne mase kod B2R-KO miševa u usporedbi s WT miševima (B2R-KO naspram WT, $P < 0,05$) (Slika 10).



Slika 10. Prije izazivanja ishemije nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 povisuje tjelesnu masu nedijabetičkih miševa, dok šećerna bolest smanjuje tjelesnu masu dijabetičnih miševa. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći jednosmjerni ANOVA test s Tukeyjevim *post hoc* testom: (*) $P < 0,05$; (****) $P < 0,0001$. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, $n = 18$; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, $n = 18$; Akita, dijabetični miševi, $n = 17$; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, $n = 18$.

5.3. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 ne utječe na krvni tlak

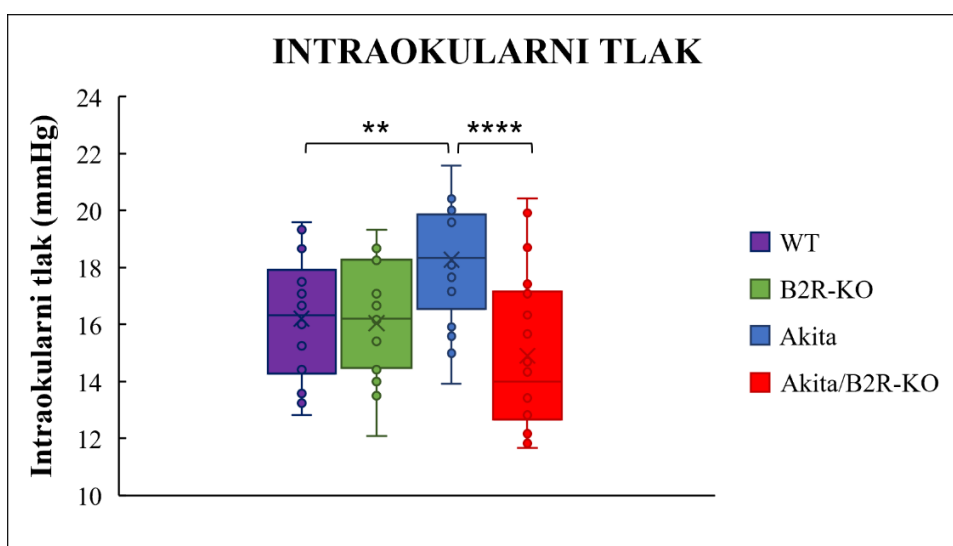
U svrhu određivanja utjecaja šećerne bolesti i nedostatka B2R-a na krvni tlak izvedeno je neinvazivno mjerenje tlaka na uspavanim životinjama. Mjerenja su pokazala da među skupinama prije MCAO zahvata nije bilo razlike u sistoličkom (Slika 11A), dijastoličkom (Slika 11B) i srednjem arterijskom tlaku (Slika 11C).



Slika 11. Šećerna bolest i nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 ne utječu na sistolički (A), dijastolički (B) i srednji arterijski tlak (C) miševa prije izazivanja ishemije. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Mješoviti model ANOVA s Tukeyjevim *post hoc* testom ne pokazuje značajne razlike među skupinama. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, $n = 18$; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, $n = 18$; Akita, dijabetični miševi, $n = 17$; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, $n = 18$.

5.4. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 sprječava razvoj povišenog intraokularnog tlaka kod dijabetičnih životinja

U svrhu određivanja utjecaja šećerne bolesti i nedostatka B2R-a na intraokularni tlak izvedeno je neinvazivno mjerenje intraokularnog tlaka tonometrom na uspavanim dijabetičnim Akita i Akita/B2R-KO i nedijabetičnim WT i B2R-KO životinjama. Mjerenja su pokazala da dijabetični Akita miševi razvijaju viši intraokularni tlak u odnosu na WT miševe (Akita naspram WT, $P < 0,01$) (Slika 12). Intraokularni tlak dijabetičnih Akita miševa također je bio značajno viši i u usporedbi s dijabetičnim Akita/B2R-KO miševima (Akita naspram Akita/B2R-KO, $P = 0,0003$). Nije bilo razlike u intraokularnom tlaku dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa i B2R-KO miševa, kao ni među nedijabetičnim skupinama.



Slika 12. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 sprječava razvoj povišenog intraokularnog tlaka kod dijabetičkih životinja prije izazivanja ishemijske. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći jednosmjerni ANOVA test uz korekciju za višestruke usporedbe kontrolirajući stopu lažnog otkrivanja ($\alpha = 0,05$): (**) $P < 0,01$; (***) $P < 0,0001$. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, $n = 18$; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, $n = 18$; Akita, dijabetični miševi, $n = 17$; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, $n = 18$.

5.5. Šećerna bolest i nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 nemaju značajan utjecaj na preživljenje u akutnoj fazi ishemijske

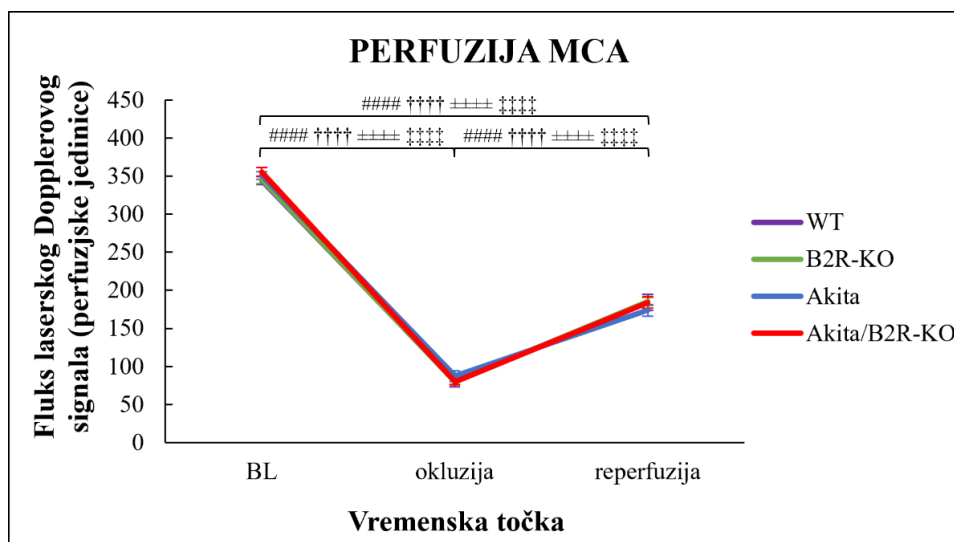
Od ukupno 24 mužjaka po skupini sojeva Akita, Akita/B2R-KO, B2R-KO i WT, 18 miševa po skupini podvrgnuto je MCAO zahvatu. Jedna životinja iz Akita/B2R-KO, po dvije

životinje iz Akita i B2R-KO skupina, te četiri životinje iz WT skupine isključene su iz daljnje analize nakon zahvata zbog lakunarne lezije, lezije izvan područja irigacije srednje moždane arterije ili hemoragijskog moždanog udara.

Analiza krivulje preživljenja pokazala je da nema značajne razlike među životinjama koje su predviđene za analizu na 3. dan nakon MCAO zahvata (Log-rank (Mantel-Coxov) test; $P > 0,5$). Međutim, iako do 3. dana nije bilo značajnih razlika u trendu preživljenja, razmjeri preživljenja pokazuju 100%-tno preživljenje životinja iz B2R-KO skupine, 77,7%-tno preživljenje u WT skupini, 87,5%-tno preživljenje u Akita skupini i 83,3%-tno preživljenje u Akita/B2R-KO skupini životinja.

5.6. Tijekom MCAO zahvata dolazi do okluzije distalnog dijela srednje moždane arterije nakon koje slijedi nepotpuna reperfuzija

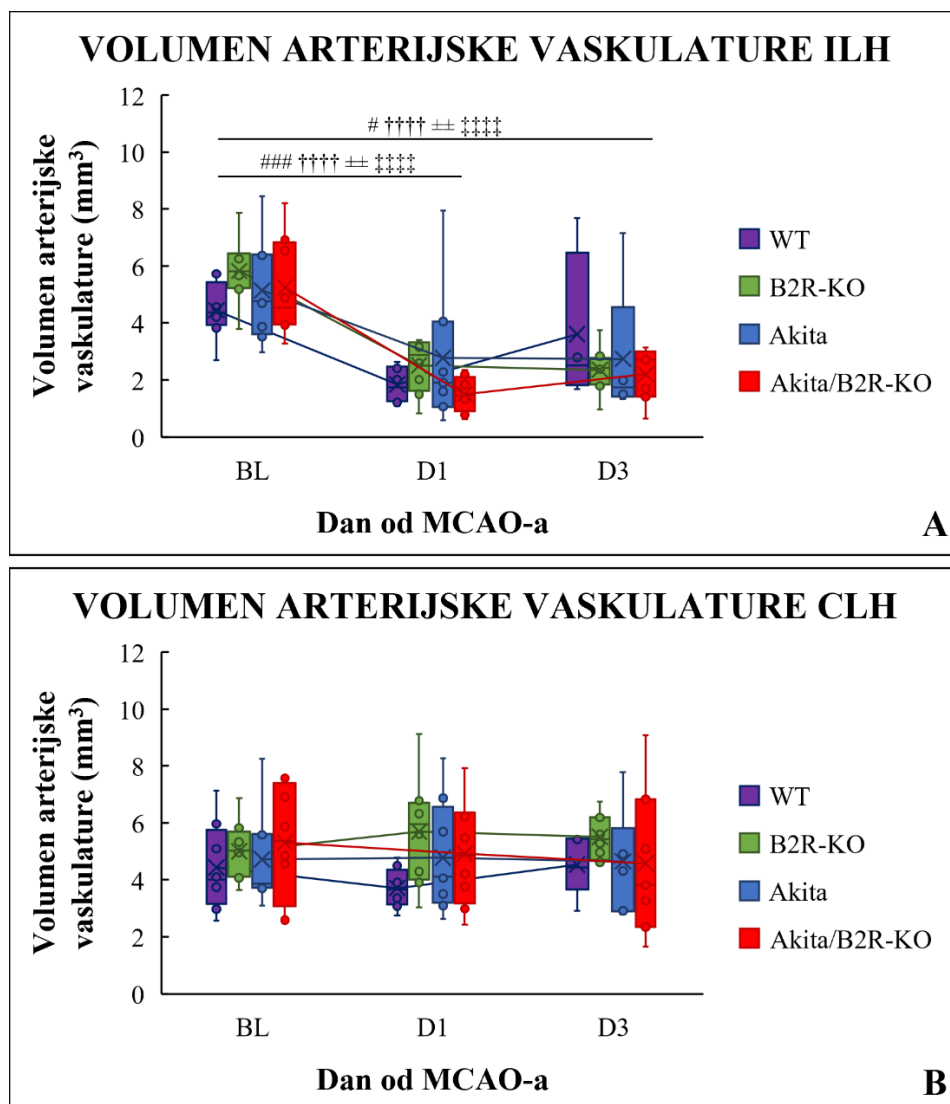
Mjerenjem i bilježenjem laserskog Dopplerovog signala (engl. *laser Doppler signal* - LDS) određen je perfuzijski status distalnog dijela srednje moždane arterije na početku MCAO zahvata te nakon umetanja i nakon izvlačenja silikonom obloženog konca kod dijabetičnih Akita i Akita/B2R-KO i kod nedijabetičnih WT i B2R-KO miševa (Slika 13). Nakon umetanja silikonom obloženog konca, zabilježen je prosječno 80%-tni pad u LDS-u, potvrđujući okluziju srednje moždane arterije. Trideset minuta nakon okluzije, izvlačenjem silikonom obloženog konca došlo je do podjednagog porasta LDS signala u svim skupinama, tj. omogućena je reperfuzija. S obzirom na to da je u ovom zahvatu unutarnja karotidna arterija trajno ligirana, LDS se nakon vađenja silikonom obloženog konca vratio na prosječno 70% vrijednosti početne razine signala, ukazujući na nepotpunu reperfuziju, tj. hipoperfuziju irigacijskog područja srednje moždane arterije. Šećerna bolest i nedostatak B2R-a nisu utjecali na perfuzijski status srednje moždane arterije tijekom MCAO zahvata.



Slika 13. Šećerna bolest i nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 ne utječu na perfuzijski status distalnog djela srednje moždane arterije mjeren tijekom MCAO zahvata. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Jednostrani ANOVA test s Tukeyjevim *post hoc* testom ne pokazuje značajne razlike među skupinama. Mješoviti model ANOVA sa Šidakovim *post hoc* testom pokazuje značajne razlike unutar WT genotipa: (####) $P < 0,0001$; B2R-KO genotipa: (††††) $P < 0,0001$; Akita genotipa: (†††††) $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO genotipa: (†††††) $P < 0,0001$. Vremenske točke: BL, početno stanje. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, $n = 18$; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, $n = 18$; Akita, dijabetični miševi, $n = 18$; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, $n = 18$.

5.7. MCAO zahvat dovodi do hipoperfuzije arterijske vaskulature ipsilateralne polutke u akutnoj fazi ishemije

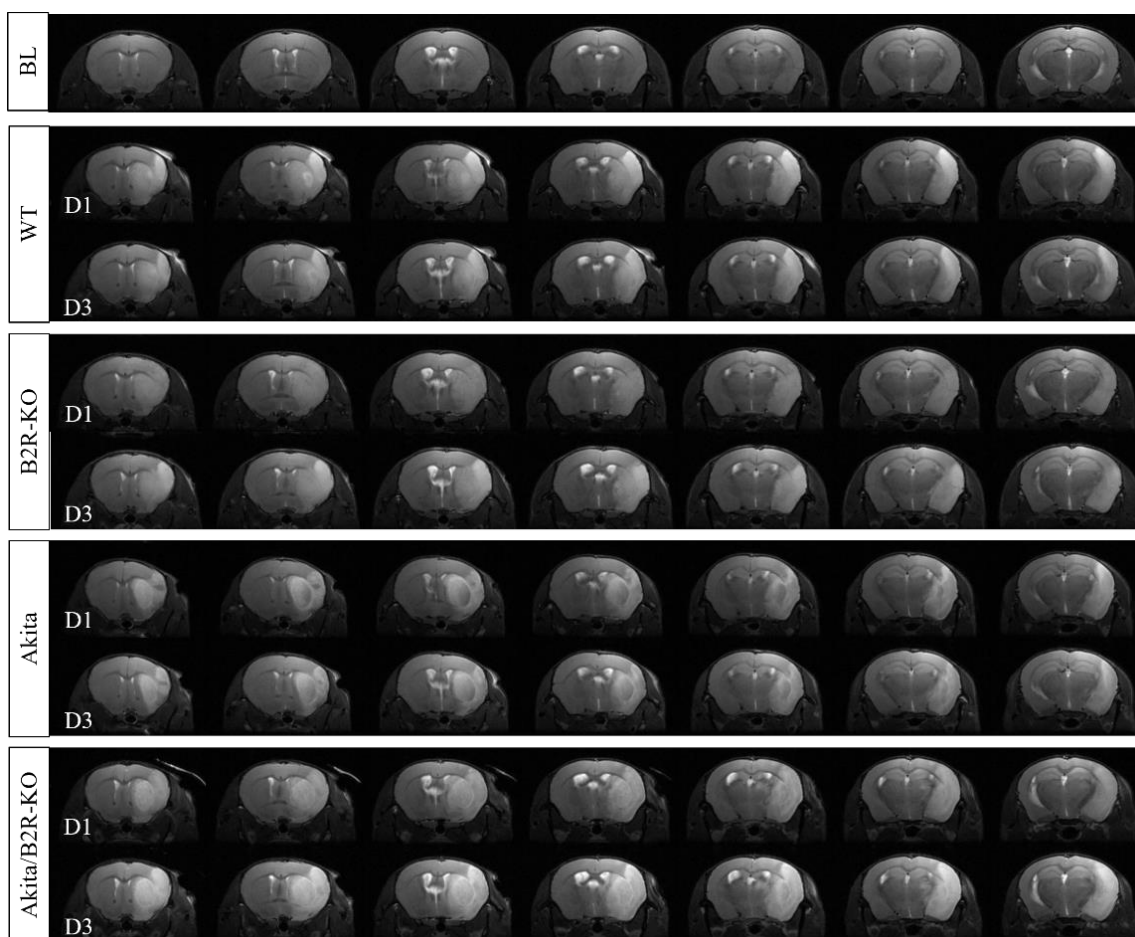
U svrhu određivanja utjecaja šećerne bolesti i nedostatka B2R-a na perfuzijski status moždanih polutki nakon MCAO zahvata u dijabetičnih Akita i Akita/B2R-KO miševa i nedijabetičnih WT i B2R-KO miševa, analizirani su volumeni arterijskih krvnih žila ILH (Slika 14A) i CLH (Slika 14B) na MR angiogramima. U svim eksperimentalnim skupinama, 1. dan od MCAO zahvata pokazana je akutna hipoperfuzija u obliku značajno manjeg volumena arterijske vaskulature ILH u odnosu na početno izmjerene volumene prije zahvata (Akita, $P < 0,01$; WT, $P < 0,001$; B2R-KO, $P < 0,001$; Akita/B2R-KO, $P < 0,0001$). Na 3. dan nije bilo značajne promjene u hipoperfuzijskom statusu ILH u odnosu na 1. dan od MCAO zahvata. Nije bilo značajnih promjena u volumenu arterijske vaskulature CLH u mjerenim vremenskim točkama.



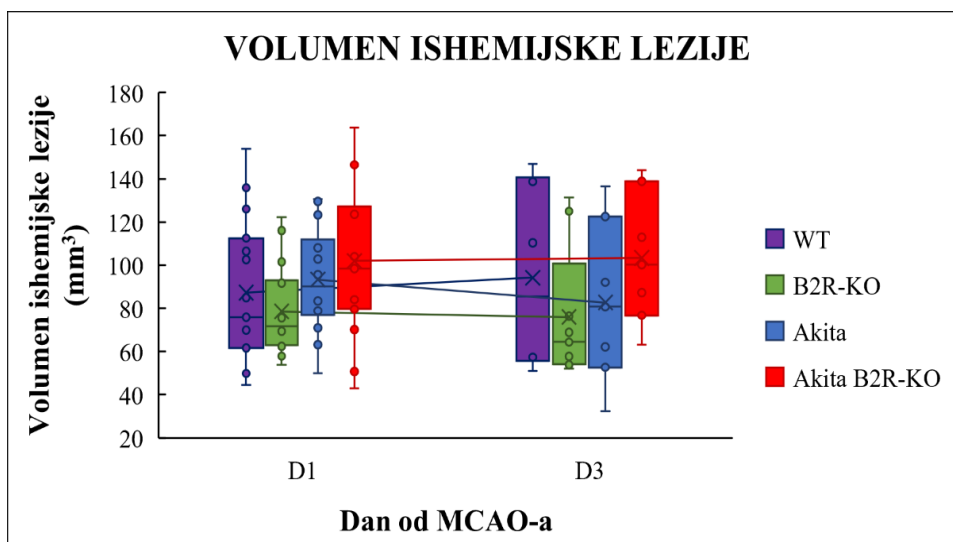
Slika 14. Volumen arterijske vaskulature ipsilateralne moždane polutke (ILH, A) svih skupina životinja je nakon MCAO zahvata značajno smanjen, a volumen arterijske vaskulature kontralateralne moždane polutke (CLH, B) ostaje nepromijenjen u odnosu na početno stanje. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Mješoviti model ANOVA s Tukeyjevim *post hoc* testom ne pokazuje značajne razlike među skupinama. Mješoviti model ANOVA sa Šidakovim *post hoc* testom pokazuje značajne razlike unutar WT genotipa: (#) $P < 0,05$, (###) $P < 0,001$; B2R-KO genotipa: (††††) $P < 0,0001$; Akita genotipa: (±±) $P < 0,01$; Akita/B2R-KO genotipa: (‡‡‡‡) $P < 0,0001$. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1) = 8, n (D3) = 5; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 8; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1) = 8, n (D3) = 6; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL) = 8, n (D1) = 7, n (D3) = 6.

5.8. Šećerna bolest i nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 nemaju značajan utjecaj na veličinu ishemijske lezije mozga nakon MCAO zahvata

U svrhu praćenja utjecaja nedostatka B2R-a i šećerne bolesti na razvoj ishemijske lezije, razvoj iste praćen je *in vivo* snimanjem mozga magnetskom rezonancijom na 1. i 3. dan od MCAO zahvata. Ishemijske lezije zahvaćale su moždanu koru i strijatum u području irigacije srednje moždane arterije te u nekim slučajevima i dijelove hipokampusa, kako je vidljivo na reprezentativnim T2 snimkama mozga (Slika 15). Volumen ishemijske lezije određen segmentacijom hiperintenzivnog područja na T2 mapi nije se značajno mijenjao u prva 3 dana od MCAO zahvata niti se razlikovao između skupina (Slika 16).



Slika 15. Reprezentativne T2 snimke mozga prikazuju morfološku strukturu zdravog mozga prije MCAO zahvata te ishemijske lezije u području moždane kore i strijatuma kod dijabetičkih Akita i Akita/B2R-KO miševa te njihovih B2R-KO i WT nedijabetičkih kontrola nakon MCAO zahvata. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa: WT, miševi divljeg tipa; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2; Akita, dijabetični miševi; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2.



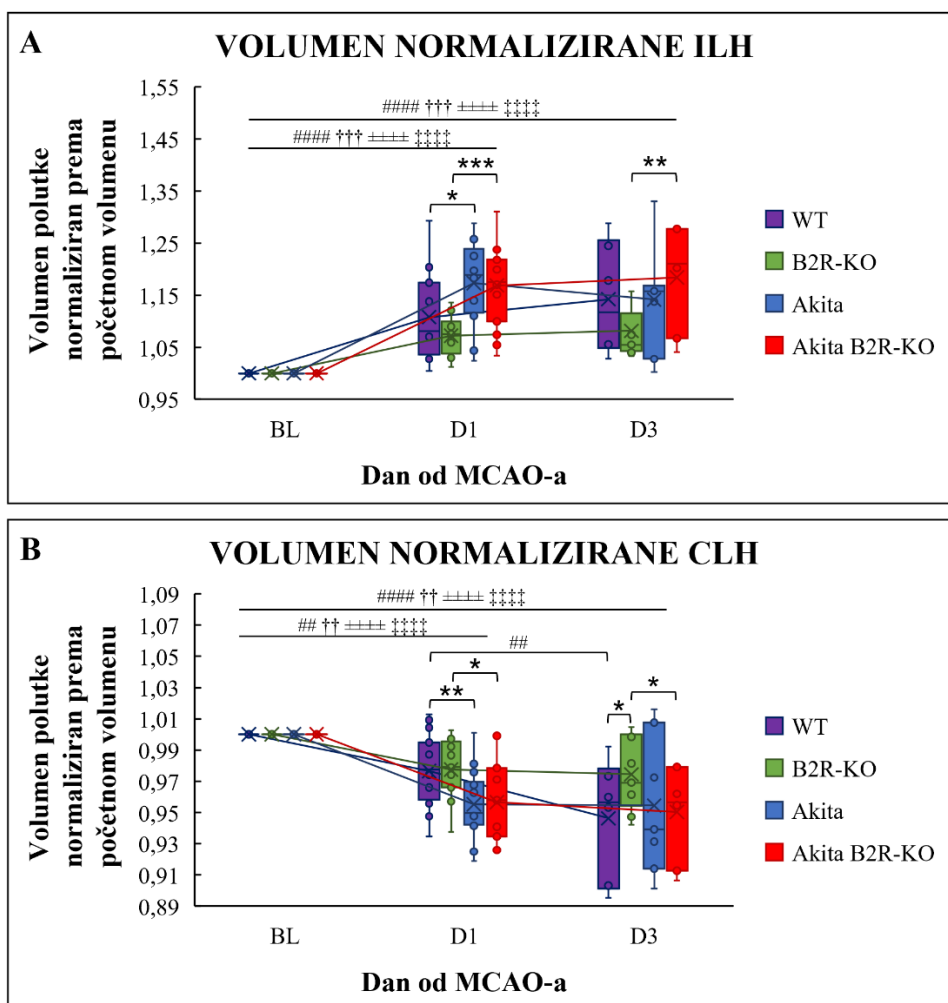
Slika 16. Šećerna bolest i nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 ne utječu na volumen ishemijske lezije prva tri dana nakon MCAO zahvata. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Mješoviti model ANOVA s Tukeyjevim *post hoc* testom ne pokazuje značajne razlike među skupinama. Vremenske točke: D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (D1) = 15, n (D3) = 6; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (D1) = 15, n (D3) = 9; Akita, dijabetični miševi, n (D1) = 14, n (D3) = 7; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (D1) = 15, n (D3) = 7.

5.9. Promjena volumena moždanih polutki u akutnoj fazi ishemije izraženija je u šećernoj bolesti

Utjecaj šećerne bolesti i nedostatka B2R-a na promjene volumena moždanih polutki izazvane razvojem lezije i vazogenog edema određene su mjerenjem volumena ILH (Slika 17A) i CLH (Slika 17B) na T2 snimkama, oduzimanjem volumena moždanih komora izmjerenih na T2 mapama te normalizacijom volumena polutki u različitim vremenskim točkama nakon MCAO zahvata prema početnom volumenu istih (BL). Usporedba volumena moždanih polutki pokazala je da je razvoj ishemijske lezije u svim skupinama praćen značajnim povećanjem volumena ILH na 1. dan (D1) od MCAO zahvata (Akita BL naspram D1, $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,0001$; B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,001$; WT BL naspram D1, $P < 0,0001$). Značajno veći volumen ILH u odnosu na početno izmjerene vrijednosti bio je vidljiv i na 3. dan (D3) od MCAO zahvata (Akita BL naspram D3, $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,0001$; B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,001$; WT BL naspram D3, $P < 0,0001$). Iako nije bilo značajne razlike u volumenu ishemijske lezije mjerene na T2 mapama, dijabetični Akita i Akita/B2R-KO miševi su na 1. dan od MCAO zahvata imali

značajno veći volumen ILH u usporedbi s nedijabetičnim WT, odnosno B2R-KO kontrolama (Akita naspram WT, $P < 0,05$; Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,001$). Značajna razlika u volumenu između Akita/B2R-KO i B2R-KO životinja zadržala se i na 3. dan od MCAO zahvata (Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,01$).

S obzirom na to da je mozak okružen tvrdom lubanjom koja ne dozvoljava njegovo širenje, ekspanzija ILH u akutnoj fazi nakon MCAO zahvata uzrokovala je značajno smanjenje volumena CLH (Slika 17B) 1. dan od MCAO zahvata u odnosu na početni volumen (BL) u svim skupinama (Akita BL naspram D1, $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,0001$; B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,01$; WT BL naspram D1, $P < 0,01$). Značajno smanjenje CLH bilo je vidljivo i na 3. dan od MCAO zahvata (Akita BL naspram D3, $P < 0,0001$; Akita B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,0001$; B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,01$; WT BL naspram D3, $P < 0,0001$). U skladu s promjenama volumena ILH, 1. dan od MCAO zahvata smanjenje volumena CLH bilo je značajno veće kod dijabetičkih Akita i Akita/B2R-KO miševa u usporedbi s WT, odnosno B2R-KO miševima (Akita naspram WT, $P < 0,01$; Akita B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,05$). Značajna razlika u volumenu između Akita/B2R-KO i B2R-KO životinja zadržala se i 3. dan od MCAO zahvata (Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,05$). Kod WT miševa je, za razliku od drugih skupina u kojima nije bilo značajne promjene među mjerenim vremenskim točkama nakon MCAO zahvata, na 3. dan izmjeren značajno manji volumen CLH u usporedbi s 1. danom (WT D1 naspram D3, $P < 0,01$) što je dovelo do značajno manjeg volumena CLH WT miševa u usporedbi s B2R-KO miševima (WT naspram B2R-KO, $P < 0,05$).

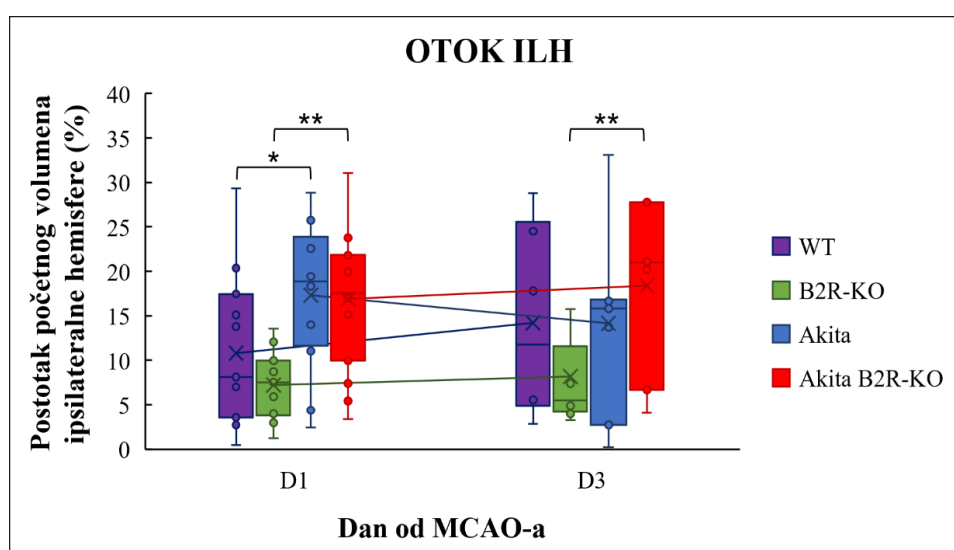


Slika 17. Povećanje volumena ipsilateralne moždane polutke (ILH, A) i smanjenje volumena kontralateralne moždane polutke (CLH, B) nakon MCAO zahvata izraženije je u prisutnosti šećerne bolesti. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći mješoviti model ANOVA s Tukeyjevim *post hoc* testom: (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,005$; (***) $P < 0,001$. Mješoviti model ANOVA sa Šidakovim *post hoc* testom pokazuje značajne razlike unutar WT genotipa: (##) $P < 0,01$, (####) $P < 0,0001$; B2R-KO genotipa: (††) $P < 0,01$, (†††) $P < 0,001$; Akita genotipa: (++++) $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO genotipa: (‡‡‡‡) $P < 0,0001$. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1) = 15, n (D3) = 6; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1) = 15, n (D3) = 9; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1) = 14, n (D3) = 7; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1) = 15, n (D3) = 7.

5.10. Razvoj edema izraženiji je u šećernoj bolesti

Kako bi se istražio utjecaj šećerne bolesti i nedostatka B2R-a na razvoj moždanog edema, promjena volumena ILH nakon MCAO zahvata dodatno je izražena kao postotak

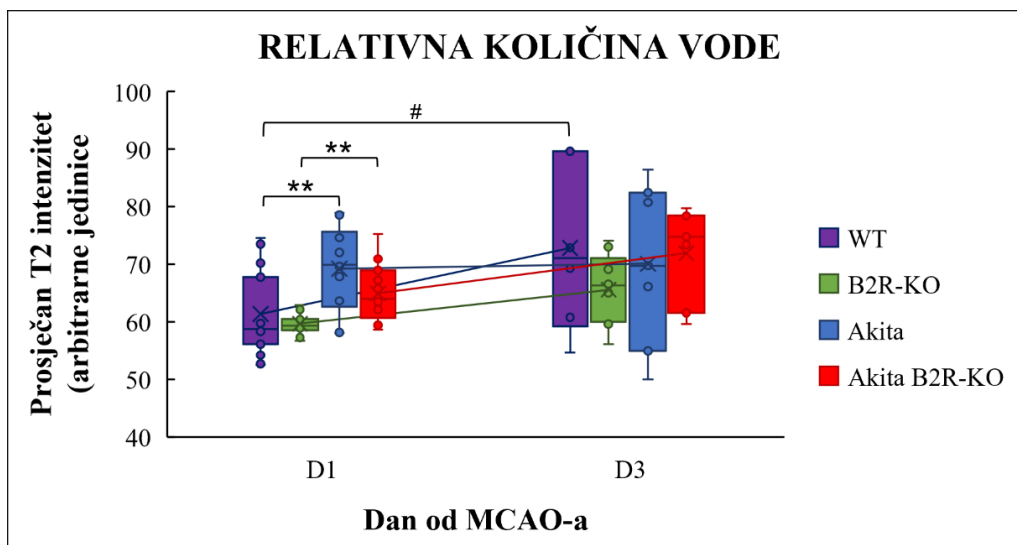
početnog volumena kako bi se kvantificirao otok uzrokovan edemom (Slika 18) te je izračunom prosječnog intenziteta signala u području lezije na T2 mapi dobivena mjera za relativnu količinu vode u području ishemijske lezije (Slika 19). Unutar skupina nije došlo do značajne promjene u otoku ILH od 1. do 3. dana nakon MCAO zahvata (Slika 18). Na 1. dan od MCAO zahvata, otok ILH bio je značajno veći kod dijabetičnih Akita i Akita/B2R-KO miševa u usporedbi s WT, odnosno B2R-KO kontrolama (Akita naspram WT, $P < 0,01$; Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,01$). Na 3. dan značajna razlika u otoku ILH se zadržala samo između Akita/B2R-KO i B2R-KO skupina (Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,01$).



Slika 18. Otok ipsilateralne moždane polutke (ILH) nakon MCAO zahvata je značajno veći u prisustvu šećerne bolesti. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći mješoviti model ANOVA s Tukeyjevim *post hoc* testom: (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,001$; (***) $P < 0,0001$. Vremenske točke: D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (D1) = 15, n (D3) = 6; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (D1) = 15, n (D3) = 9; Akita, dijabetični miševi, n (D1) = 14, n (D3) = 7; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (D1) = 15, n (D3) = 7.

Relativna količina vode u području lezije je na 1. dan od MCAO zahvata također bila značajno veća kod dijabetičnih Akita i Akita/B2R-KO miševa u usporedbi s WT, odnosno B2R-KO kontrolama (Akita naspram WT, $P < 0,01$; Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,05$) (Slika 19). Treći dan od MCAO zahvata nije bilo razlike u relativnoj količini vode u području lezije među skupinama. Međutim, kod WT miševa je došlo do značajnog povećanja u relativnoj

količini vode u području lezije u odnosu na 1. dan za razliku od B2R-KO i dijabetičnih skupina kod kojih se to nije dogodilo (WT D1 naspram D3, $P < 0,05$).



Slika 19. Relativna količina vode u području lezije nakon MCAO zahvata značajno je veća u prisustvu šećerne bolesti. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći mješoviti model ANOVA s Tukeyjevim *post hoc* testom: (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,005$. Mješoviti model ANOVA sa Šidakovim *post hoc* testom pokazuje značajne razlike unutar WT genotipa: (#) $P < 0,05$. Vremenske točke: D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (D1) = 15, n (D3) = 6; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (D1) = 15, n (D3) = 9; Akita, dijabetični miševi, n (D1) = 14, n (D3) = 7; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (D1) = 15, n (D3) = 7.

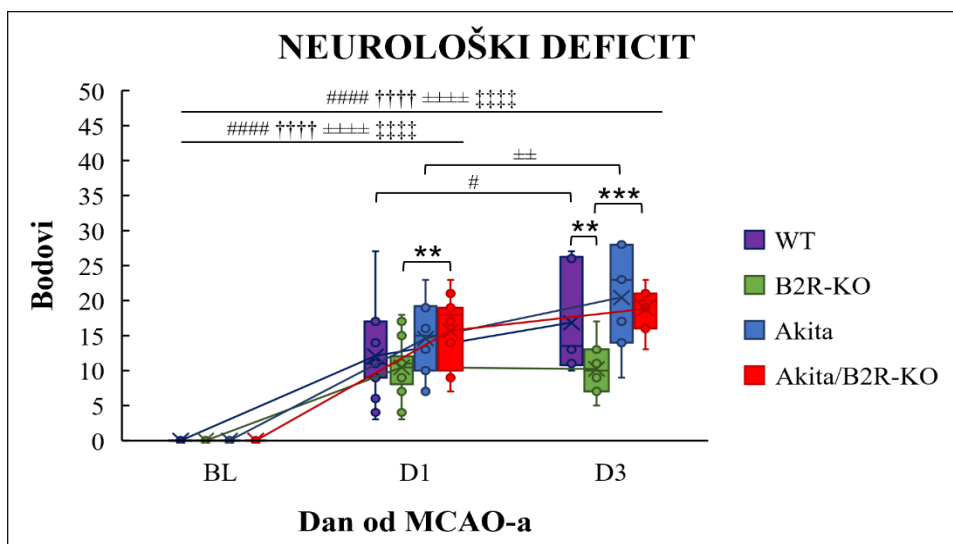
5.11. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 poboljšava neurološki status u akutnoj fazi ishemije

U svrhu određivanja utjecaja šećerne bolesti i nedostatka B2R-a na razvoj neurološkog deficita životinjama je određivan neurološki status prije (BL) te 1. (D1) i 3. dan (D3) od MCAO zahvata. Prilikom ulaska u pokus životinje nisu pokazivale znakove neurološkog deficita. Na 1. i 3. dan od MCAO zahvata sve eksperimentalne životinje su pokazivale značajan neurološki deficit koji se očitovao promjenom u izgledu, pokretljivosti i spontanoj aktivnosti, hodu, posturi, proprioceptiji i refleksima u odnosu na mjerene parametre prije MCAO zahvata (Akita BL naspram D1, $P < 0,0001$; Akita BL naspram D3, $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,0001$; B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,0001$;

B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,0001$; WT BL naspram D1, $P < 0,0001$; WT BL naspram D3, $P < 0,0001$) (Slika 20).

Razvoj neurološkog deficita se značajno razlikovao među skupinama. Neurološki status WT miševa i dijabetičnih Akita se značajno se pogoršao na 3. dan u odnosu na 1. dan od MCAO zahvata (Akita D1 naspram D3, $P < 0,0027$; WT D1 naspram D3, $P < 0,05$). S druge strane, kod B2R-KO i Akita/B2R-KO miševa nije bilo značajne razlike u težini neurološkog deficita između 1. i 3. dana od MCAO zahvata. Štoviše, miševi B2R-KO skupine imali su značajno bolji neurološki status od dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa na 1. dan od MCAO zahvata (Akita/B2R-KO D1 naspram B2R-KO D1, $P < 0,01$), te od Akita/B2R-KO i WT miševa na 3. dan od MCAO zahvata (Akita/B2R-KO D3 naspram B2R-KO D3, $P < 0,001$; B2R-KO D3 naspram WT D3, $P < 0,01$). Kod WT miševa i dijabetičnih Akita nije bilo značajne razlike u težini neurološkog deficita u prva 3 dana nakon MCAO zahvata.

Šećerna bolest i nedostatak B2R-a nisu značajno utjecali na pad tjelesne mase u eksperimentalnim skupinama nakon MCAO zahvata. U svim skupinama je zabilježen pad od prosječno 10% početne tjelesne mase na 1. dan od MCAO zahvata te dodatno prosječno 5% na 3. dan od MCAO zahvata.



Slika 20. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 smanjuje neurološki deficit u akutnoj fazi ishemije. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći mješoviti model ANOVA s Tukeyjevim *post hoc* testom: (***) $P < 0,001$; (**) $P < 0,01$. Mješoviti model ANOVA sa Šidakovim *post hoc* testom pokazuje značajne razlike unutar WT genotipa: (#) $P < 0,05$, (####) $P < 0,0001$; B2R-KO genotipa: (††††) $P < 0,0001$; Akita genotipa: (±±) $P < 0,01$, (±±±±) $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO genotipa: (‡‡‡‡) $P < 0,0001$. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1) = 15, n (D3) = 6; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1) = 15, n (D3) = 9; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1) = 14, n (D3) = 7; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL) = 15, n (D1) = 15, n (D3) = 7.

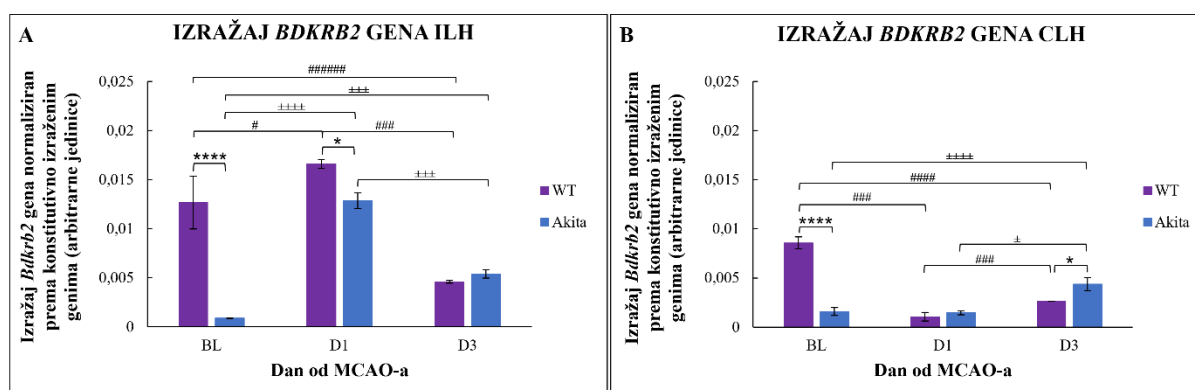
5.12. Šećerna bolest mijenja genski izražaj bradikininskih receptora u mozgu prije i nakon ishemijske ozljede

U svrhu određivanja utjecaja šećerne bolesti na genski izražaj bradikininskih receptora u moždanim polutkama prije i nakon ishemijske ozljede, odrađena je analiza relativnog izražaja mRNA bradikininskih receptora qPCR-om prije i nakon MCAO zahvata.

Izražaj gena za B2R u moždanim polutkama Akita i WT skupina uspješno je određen u odnosu na uzorke iz B2R-KO i Akita/B2R-KO životinja, kod kojih očekivano nije došlo do amplifikacije cDNA, potvrđujući da zbog delecije kodirajuće sekvence u te dvije skupine životinja ne dolazi do transkripcije *Bdkrb2* gena. Prije MCAO zahvata (BL), izražaj gena za B2R u ILH (Slika 21A) i CLH (Slika 21B) dijabetičnih Akita miševa bio je značajno niži u usporedbi s izražajem kod WT miševa (Akita ILH naspram WT ILH, $P < 0,0001$; Akita CLH naspram WT CLH, $P < 0,0001$). U ILH-u Akita i WT miševa na 1. dan od MCAO zahvata, kao

odgovor na nastalu ishemijsku leziju, došlo je do značajnog povećanja izražaja gena za B2R (Akita BL naspram D1, $P < 0,0001$; WT BL naspram D1, $P < 0,05$), međutim i dalje je izražaj u Akita miševima bio značajno niži u odnosu na WT miševima (Akita naspram WT, $P < 0,05$). Na 3. dan od MCAO zahvata izražaj gena za B2R značajno je pao u obje skupine (Akita D1 naspram D3, $P < 0,001$; WT D1 naspram D3, $P < 0,0001$) te se razlika između skupina izgubila. Međutim, dok je izražaj u WT miševa pao na razinu ispod početne vrijednosti (WT BL naspram D3, $P < 0,001$), izražaj u Akita miševa se zadržao na značajno višim vrijednostima od početnih (Akita BL naspram D3, $P < 0,05$).

U CLH-u WT miševa na 1. dan je došlo do značajnog pada u izražaju gena za B2R u odnosu na početne vrijednosti (WT BL naspram D1, $P < 0,0001$) i izjednačavanja izražaja gena za B2R među skupinama. Na 3. dan od MCAO zahvata došlo je do blagog porasta u izražaju gena za B2R u obje skupine životinja (Akita D1 naspram D3, $P < 0,001$; WT D1 naspram D3, $P < 0,05$), ali je taj porast bio značajno veći za dijabetične Akita miševima (Akita naspram WT, $P < 0,05$).



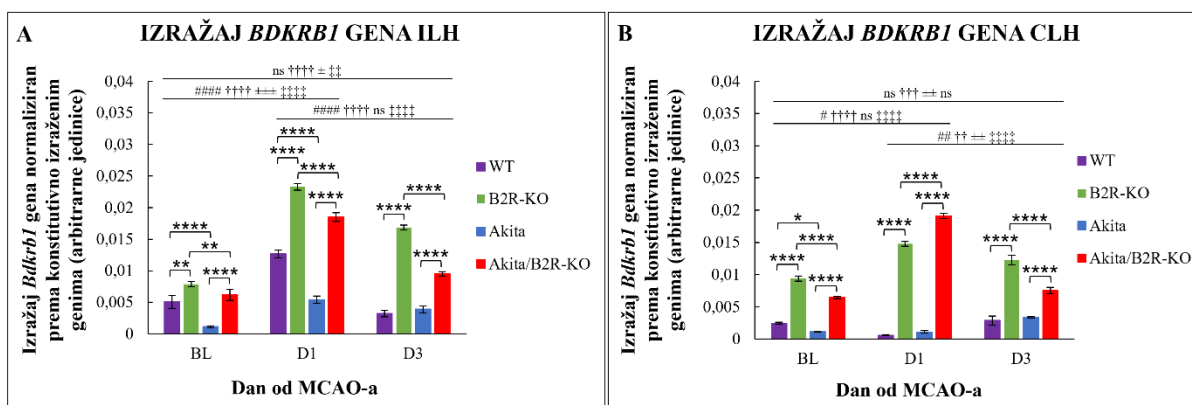
Slika 21. Šećerna bolest mijenja izražaj *Bdkrb2* gena prije i nakon MCAO zahvata u ipsilateralnoj (ILH, A) i kontralateralnoj (CLH, B) moždanoj polutci. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći jednosmjerni ANOVA test uz korekciju za višestruke usporedbe kontrolirajući stopu lažnog otkrivanja ($\alpha = 0,05$): (*) $P < 0,05$; (****) $P < 0,0001$. Statistički značajne razlike unutar WT genotipa: (#) $P < 0,05$, (####) $P < 0,001$, (#####) $P < 0,0001$; Akita genotipa: (\pm) $P < 0,05$, (++++) $P < 0,001$, (+++++) $P < 0,0001$. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1, D3) = 3; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1, D3) = 3.

Izražaj gena za B1R potvrđen je u svim skupinama. Prije MCAO zahvata (BL), izražaj gena za B1R u ILH-u (Slika 22A) i CLH-u (Slika 22B) bio je značajno niži kod dijabetičnih

Akita i Akita/B2R-KO miševa u usporedbi s WT, odnosno B2R-KO kontrolama (Akita ILH naspram WT ILH, $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO ILH naspram B2R-KO ILH, $P < 0,01$; Akita CLH naspram WT CLH, $P < 0,05$; Akita/B2R-KO CLH naspram B2R-KO CLH, $P < 0,0001$). Osim toga, pokazano je da nedostatak gena za B2R utječe na izražaj gena za B1R. Izražaj gena za B1R u ILH-u i CLH-u, prije MCAO zahvata, bio je značajno viši kod Akita/B2R-KO i B2R-KO miševa u usporedbi s Akita, odnosno WT miševima, ukazujući na mogući kompenzacijski mehanizam među bradikininskim receptorima (Akita ILH naspram Akita/B2R-KO ILH, $P < 0,0001$; WT ILH naspram B2R-KO ILH, $P < 0,01$; Akita CLH naspram Akita/B2R-KO CLH, $P < 0,0001$; WT CLH naspram B2R-KO CLH, $P < 0,0001$).

Na 1. dan od MCAO zahvata u svim je skupinama došlo do značajnog porasta izražaja gena za B1R (BL naspram D1, $P < 0,0001$). Razlike u izražaju gena za B1R u ILH-u vidljive prije zahvata zadržale su se i na 1. dan od MCAO zahvata (Akita naspram WT, $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,0001$; Akita naspram Akita/B2R-KO, $P < 0,0001$; WT naspram B2R-KO, $P < 0,0001$). Na 3. dan od MCAO zahvata razina izražaja u ILH-u pada u odnosu na 1. dan, pri čemu je izražaj pao na vrijednosti ispod početnih samo za WT miševa (BL naspram D3, $P < 0,05$), dok su kod Akita, Akita/B2R-KO i B2R-KO miševa vrijednosti i dalje više od početnih (BL naspram D3, $P < 0,0001$). Na 3. dan, razlika u izražaju gena za B1R opisana za 1. dan gubi se među Akita i WT miševima. Izražaj gena za B1R u Akita/B2R-KO i B2R-KO skupini ostao je značajno viši u usporedbi s Akita, odnosno WT skupinom i na 3. dan od MCAO zahvata (Akita naspram Akita/B2R-KO, $P < 0,0001$; WT naspram B2R-KO, $P < 0,0001$).

U CLH-u 1. dan od MCAO zahvata dolazi do pada u izražaju gena za B1R kod WT miševa (BL naspram D1, $P < 0,01$), smanjujući razliku u izražaju u odnosu na dijabetične Akita miševa. Kod dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa izražaj B1R gena na 1. dan značajno raste u odnosu na B2R-KO miševa (Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,0001$), iako u obje skupine dolazi do porasta u izražaju (BL naspram D1, $P < 0,001$). Na 3. dan, vrijednosti izražaja kod Akita/B2R-KO se vraćaju na početne vrijednosti, te je izražaj niži u usporedbi s B2R-KO kontrolama (Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,0001$). Izražaj gena za B1R raste za WT i Akita skupinu na 3. dan u odnosu na 1. dan (D1 naspram D3, $P < 0,001$). U obje vremenske točke nakon MCAO zahvata, izražaj gena za B1R bio je značajno viši u Akita/B2R-KO i B2R-KO skupini u usporedbi s Akita, odnosno WT skupinom (Akita D1 naspram Akita/B2R-KO D1, $P < 0,0001$; Akita D3 naspram Akita/B2R-KO D3, $P < 0,0001$; WT D1 naspram B2R-KO D1, $P < 0,0001$; WT D3 naspram B2R-KO D3, $P < 0,0001$).



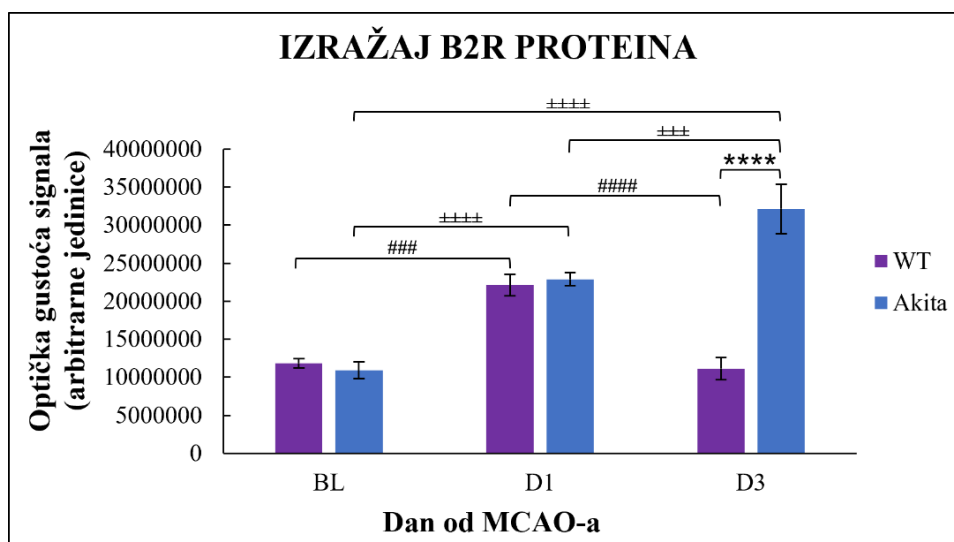
Slika 22. Šećerna bolest i nedostatak bradikininog receptora tipa 2 mijenjaju izražaj *Bdkrb1* gena prije i nakon MCAO zahvata u ipsilateralnoj (ILH, A) i kontralateralnoj (CLH, B) moždanoj polutci. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći mješoviti ANOVA test uz korekciju za višestruke usporedbe kontrolirajući stopu lažnog otkrivanja ($\alpha=0,05$): (*) $P<0,05$; (**) $P<0,01$; (***) $P<0,0001$. Statistički značajne razlike unutar WT genotipa: (#) $P<0,05$, (##) $P<0,01$; (####) $P<0,0001$; B2R-KO genotipa: (††) $P<0,01$, (†††) $P<0,001$, (††††) $P<0,0001$; Akita genotipa: (\pm) $P<0,05$; ($\pm\pm$) $P<0,01$; ($\pm\pm\pm$) $P<0,001$; Akita/B2R-KO genotipa: (\ddagger) $P<0,01$, ($\ddagger\ddagger\ddagger$) $P<0,0001$. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1, D3) = 3; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1, D3) = 3; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3.

5.13. Šećerna bolest mijenja proteinski izražaj bradikininских receptora u mozgu nakon ishemijske ozljede

U svrhu određivanja utjecaja šećerne bolesti na proteinski izražaj bradikininских receptora u ILH-u prije te na 1. i 3. dan nakon MCAO zahvata, određena je integrirana optička gustoća fluorescentnog signala na područjima od interesa histoloških rezova obilježenih specifičnim protutijelima za bradikininские receptore. Proteinski izražaj B1R-a određen je u svim skupinama (Slika 24), dok je izražaj B2R-a određen samo za Akita i WT skupinu (Slika 23), s obzirom na to da je PCR analizom potvrđeno da u Akita/B2R-KO i B2R-KO skupini ne dolazi do transkripcije gena za B2R.

Proteinski izražaj B2R-a u mozgu dijabetičnih Akita miševa prije izazivanja ishemije (BL) bio je jednak izražaju kod WT miševa, međutim nakon MCAO zahvata u obje skupine dolazi do značajnog porasta u izražaju u odnosu na početno izmjerenu optičku gustoću signala (Akita BL naspram D1, $P<0,0001$; WT BL naspram D1, $P<0,001$). Na 3. dan od zahvata izražaj B2R-a značajno raste samo za Akita skupinu (Akita D1 naspram D3, $P<0,001$), dok se za WT

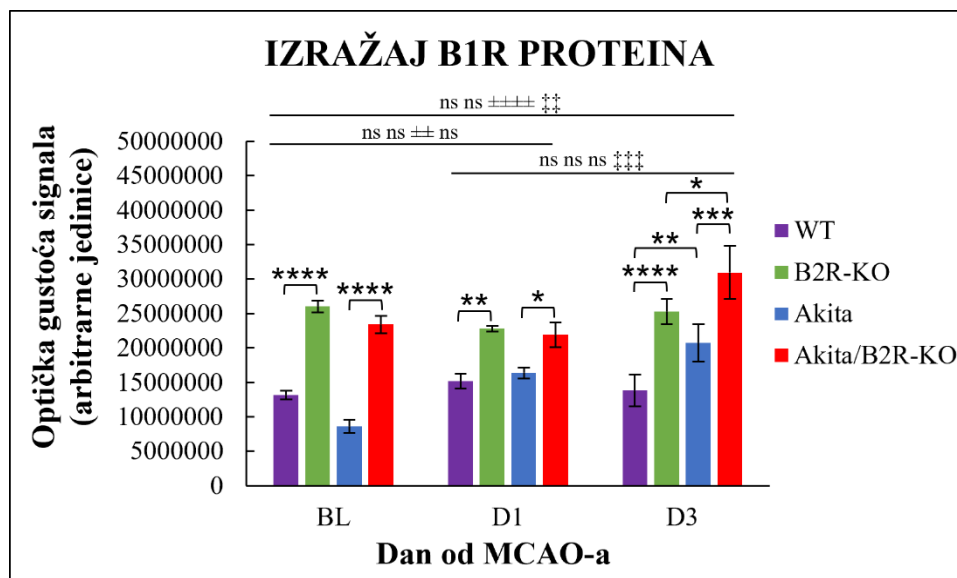
skupinu izražaj vraća na početnu vrijednost (WT D1 naspram D3, $P < 0,0001$), što stvara razliku u među skupinama (Akita D3 naspram WT D3, $P < 0,0001$).



Slika 23. Šećerna bolest mijenja proteinski izražaj bradikininskog receptora tipa 2 (B2R) ipsilateralne moždane polutke u akutnoj fazi nakon MCAO zahvata. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći jednosmjerni ANOVA test uz korekciju za višestruke usporedbe kontrolirajući stopu lažnog otkrivanja ($\alpha=0,05$): (****) $P < 0,0001$. Statistički značajne razlike unutar WT genotipa: (###) $P < 0,001$, (####) $P < 0,0001$; Akita genotipa: (±±±) $P < 0,001$, (±±±±) $P < 0,0001$. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1, D3) = 3; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1, D3) = 3.

Prije izazivanja ishemijske lezije (BL), proteinski izražaj B1R-a u skupinama s nedostatkom B2R-a (Akita/B2R-KO i B2R-KO) bio je podjednak, ali značajno viši od razine izražaja u Akita, odnosno WT skupini (Akita/B2R-KO naspram Akita; $P < 0,0001$; B2R-KO naspram WT, $P < 0,0001$). Nakon izazivanja ishemije, na 1. dan dolazi do značajnog porasta vrijednosti izražaja B1R-a u Akita miševa (Akita BL naspram D1, $P < 0,01$), smanjujući razliku u izražaju prema Akita/B2R-KO skupini. U ostalim skupinama na 1. dan nije došlo do značajne promjene u izražaju B1R-a. Treći dan od MCAO zahvata vrijednost izražaja B1R-a Akita/B2R-KO skupine značajno raste (Akita/B2R-KO D1 naspram D3, $P < 0,001$), stvarajući razliku u izražaju u odnosu na B2R-KO skupinu (Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,05$). Također, dodatnim blagim porastom u Akita skupini te blagim padom u WT skupini stvorila

se značajna razlika u izražaju B1R među ovim skupinama na 3. dan od zahvata (Akita naspram WT, $P < 0,01$).

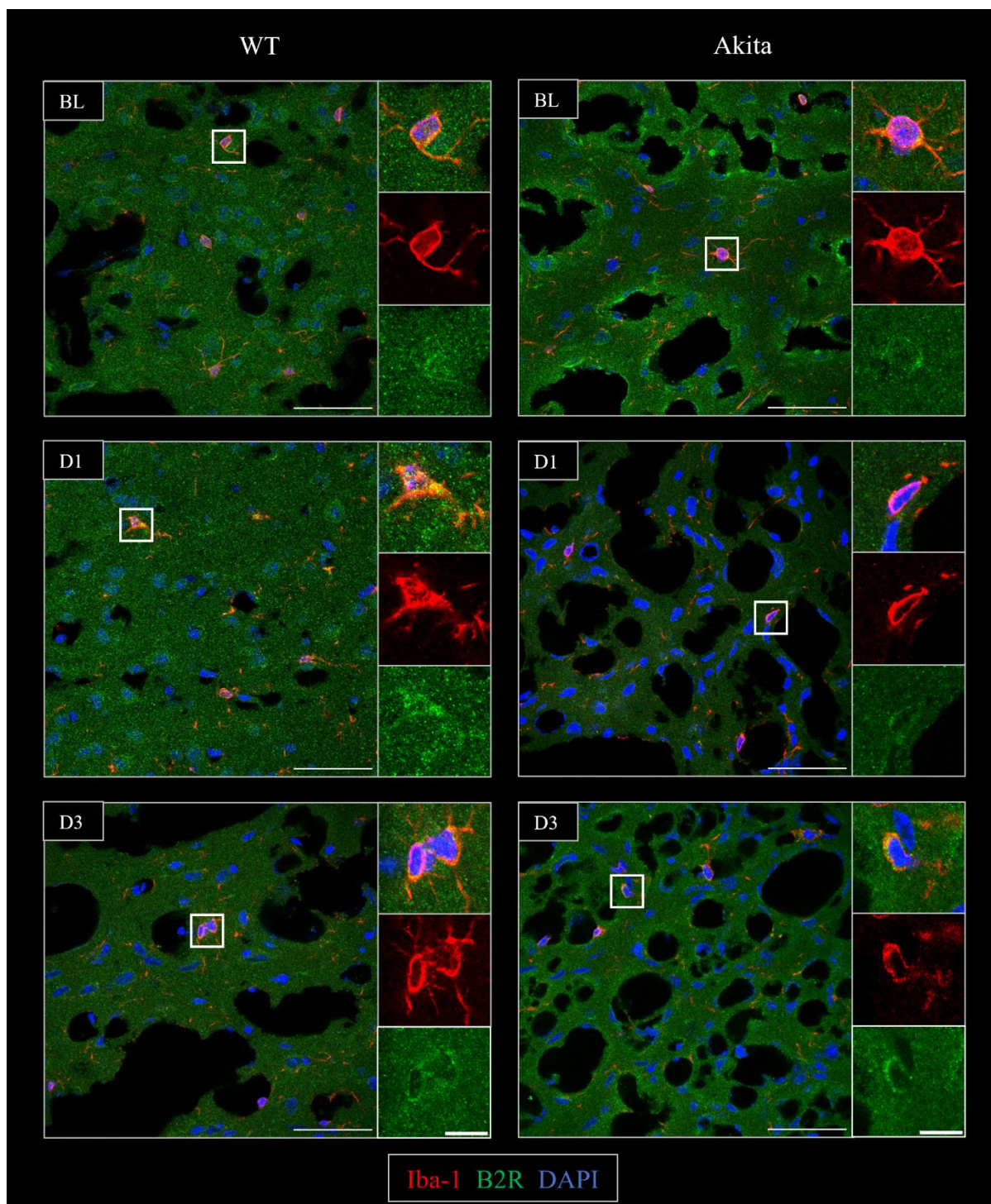


Slika 24. Šećerna bolest i nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 mijenjaju proteinski izražaj bradikininskog receptora tipa 1 (B1R) ipsilateralne moždane polutke nakon MCAO zahvata. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći mješoviti ANOVA test uz korekciju za višestruke usporedbe kontrolirajući stopu lažnog otkrivanja ($\alpha=0,05$): (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$; (***) $P < 0,001$; (****) $P < 0,0001$. Statistički značajne razlike unutar Akita genotipa: (++) $P < 0,01$; (++++) $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO genotipa: (‡‡) $P < 0,01$, (‡‡‡) $P < 0,001$. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1, D3) = 3; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1, D3) = 3; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3.

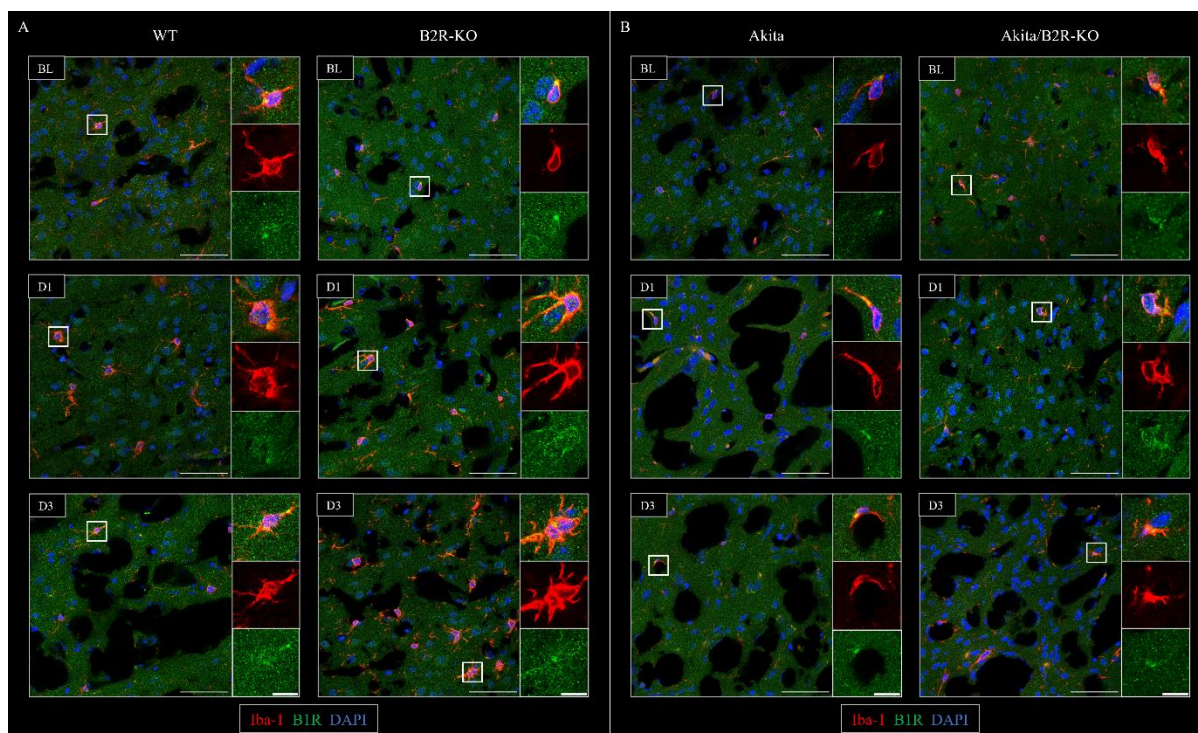
5.14. Stanice mikroglije u mozgu izražavaju oba tipa bradikinskih receptora

S ciljem određivanja izražaja oba tipa bradikininskih receptora na stanicama mikroglije prije i nakon MCAO zahvata, provedena je metoda dvostrukog imunofluorescentnog obilježavanja tkiva korištenjem protutijela koja se specifično vežu na B1R ili B2R u kombinaciji s protutijelom za mikrogliju (Iba1) u vremenskim točkama prije te 1. i 3. dana nakon MCAO zahvata. Analiza rezultata pokazuje kako je B2R u stanicama mikroglije izražen

samo u Akita i WT skupinama, u sve tri vremenske točke (Slika 25), dok je B1R izražen kod sve četiri eksperimentalne skupine u sve tri vremenske točke (Slika 26).



Slika 25. Reprezentativne slike izražaja bradikinskog receptora tipa 2 (B2R) na stanicama mikroglije dijabetičnih Akita miševa i nedijabetičnih WT kontrola. Rezovi mišjeg mozga dvostruko imunofluorescentno obilježeni s B2R protutijelom (zeleno) u kombinaciji s Iba1 protutijelom (crveno). Umetak prikazuje povećanu stanicu mikroglije i kolokalizaciju crvenog Iba1 signala specifičnog za mikrogliju sa zelenim signalom za B2R, dokazujući prisutnost B2R-a na stanicama mikroglije u svim vremenskim točkama. DAPI-pozitivne jezgre (plavo). Mjerna oznaka: slika 50 μm , umetak 10 μm . Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa: WT, miševi divljeg tipa; Akita, dijabetični miševi.



Slika 26. Reprezentativne slike izražaja bradikininskog receptora tipa 1 (B1R) na stanicama mikroglije u nedijabetičkih WT i B2R-KO miševa (A) i dijabetičnih Akita i Akita/B2R-KO miševa (B). Rezovi mišjeg mozga dvostruko imunofluorescentno obilježeni s B1R protutijelom (zeleno) u kombinaciji s Iba1 protutijelom (crveno). Umetak prikazuje povećanu stanicu mikroglije i kolokalizaciju crvenog Iba1 signala specifičnog za mikrogliju sa zelenim signalom za B1R dokazujući prisutnost B1R-a na stanicama mikroglije u svim vremenskim točkama. DAPI-pozitivne jezgre (plavo). Mjerna oznaka: slika 50 μm , umetak 10 μm . Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa: WT, miševi divljeg tipa; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2; Akita, dijabetični miševi; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2.

5.15. Brojnost i aktivacijski profil stanica mikroglije prije i nakon ishemijske ozljede mozga promijenjeni su u šećernoj bolesti i kod nedostatka bradikininskog receptora tipa 2

U svrhu određivanja utjecaja šećerne bolesti i nedostatka B2R-a na odgovor stanica mikroglije na ishemijsku ozljedu mozga, odrađena je automatska analiza brojnosti uz određivanje trodimenzionalne morfologije stanica mikroglije bojenih imunofluorescentnim Iba1-specifičnim biljekom u osam točaka koje su obuhvaćale lezijsko i perilezijsko područje kore i strijatuma na ILH-u te odgovarajuća područja na CLH-u. S obzirom na to da trenutno ne postoje dovoljno specifični biljezi koji bi točno odredili stupanj aktivacijskog stanja mikroglije, detaljna analiza trodimenzionalne morfologije omogućila nam je određivanje aktivacijskog

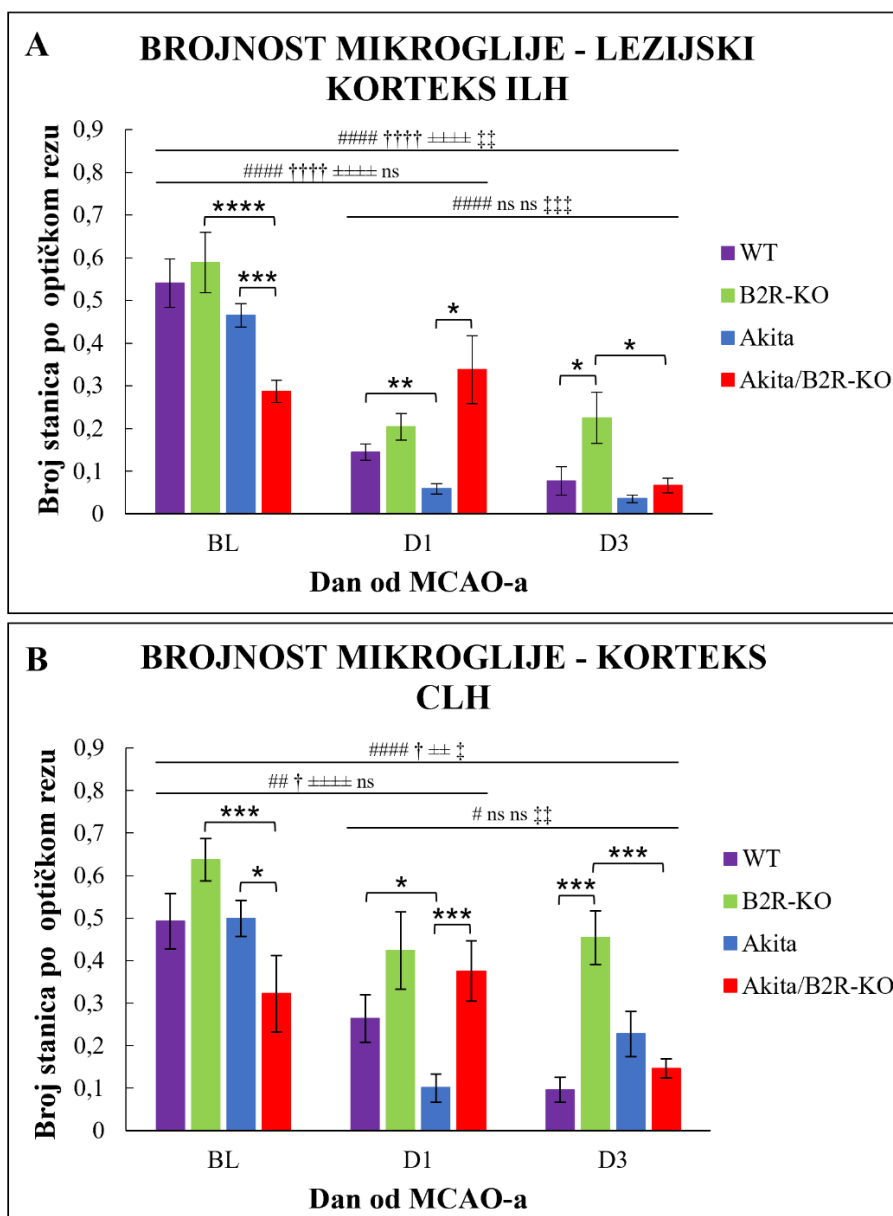
profila stanica mikroglije te procjenu utjecaja šećerne bolesti i nedostatka B2R-a na isti prije i nakon izazivanja ishemije. Usporedbom rezultata dobivenih u različitim vremenskim točkama od MCAO zahvata određene su promjene u brojnosti i aktivacijskom profilu stanica mikroglije prouzročene ishemijskom ozljedom, dok je usporedbom rezultata dobivenih u pojedinačnim skupinama u svakoj vremenskoj točki ispitan utjecaj šećerne bolesti i nedostataka B2R-a na promjenu u brojnosti i aktivacijskom profilu stanica mikroglije.

5.15.1. Postishemijski pad broja stanica mikroglije u području lezije kore povećan je u prisutnosti šećerne bolesti, a smanjen u nedostatku bradikininskog receptora tipa 2

Broj stanica mikroglije u području lezije kore ILH (Slika 27A) u dijabetičnih Akita miševa prije MCAO zahvata bio je podjednak broju stanica u WT miševima. U obje skupine je kao posljedica ishemije došlo do značajnog gubitka stanica mikroglije već na 1. dan od MCAO zahvata te je broj stanica ostao snižen i na 3. dan (WT BL naspram D1, $P < 0,0001$; BL naspram D3, $P < 0,0001$; Akita BL naspram D1, $P < 0,0001$; Akita BL naspram D3, $P < 0,0001$). Na 1. dan od MCAO zahvata broj stanica u dijabetičnih Akita miševa bio je značajno manji u usporedbi s WT miševima (Akita naspram WT, $P < 0,01$), međutim do 3. dana se broj stanica u ove dvije skupine izjednačio. Broj stanica mikroglije ILH kod dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa prije MCAO zahvata bio je značajno niži u usporedbi s nedijabetičnim B2R-KO miševima (Akita naspram Akita/B2R-KO BL, $P < 0,01$). Kod B2R-KO miševa je na 1. dan od MCAO zahvata došlo do značajnog pada u broju stanica mikroglije što je dovelo do izjednačavanja broja stanica u usporedbi s dijabetičnom Akita/B2R-KO skupinom (B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,0001$; B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,0001$). Kod dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa do značajnog pada u broju stanica mikroglije u lezijom zahvaćenoj kori ILH dolazi tek na 3. dan od MCAO zahvata (Akita/B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,01$; Akita/B2R-KO D1 naspram D3, $P < 0,01$). Broj preostalih stanica mikroglije na 3. dan u dijabetičnoj Akita/B2R-KO skupini bio je značajno manji u odnosu na B2R-KO skupinu (Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,05$). Broj stanica mikroglije u dijabetičnih Akita miševa prije MCAO zahvata bio je značajno veći u usporedbi s dijabetičnim Akita/B2R-KO miševima (Akita naspram Akita/B2R-KO, $P < 0,001$). Nakon zahvata, na 1. dan je broj stanica u dijabetičnih Akita miševa bio značajno manji u usporedbi s dijabetičnim Akita/B2R-KO miševima (Akita naspram Akita/B2R-KO, $P < 0,05$), dok se na 3. dan broj stanica u ove dvije

skupine izjednačio. Broj stanica mikroglije u B2R-KO miševa prije MCAO zahvata bio je podjednak broju stanica u WT miševima. Na 1. dan od zahvata nije bilo razlike, no na 3. dan je broj stanica bio značajno manji u WT miševa u odnosu na B2R-KO skupinu (B2R-KO naspram WT, $P < 0,05$).

U istom području CLH (Slika 27B), kod Akita miševa je prije MCAO zahvata broj stanica bio podjednak broju stanica u WT miševima. Zanimljivo je da je nakon MCAO zahvata i u ovom ishemijskom nezahvaćenom području u obje skupine zabilježen značajni pad u broju stanica već na 1. dan (WT BL naspram D1, $P < 0,01$; Akita BL naspram D1, $P < 0,0001$). Međutim, broj stanica mikroglije na 1. dan značajno je manji u dijabetičnih Akita miševa u usporedbi s WT miševima (Akita naspram WT, $P < 0,05$). Na 3. dan od MCAO zahvata broj stanica u WT miševa dodatno pada, dok u dijabetičnih Akita raste u odnosu na 1. dan zbog čega dolazi do izjednačenja u broju između ove dvije skupine (WT D1 naspram D3, $P < 0,05$; Akita D1 naspram D3, $P < 0,05$). Broj stanica mikroglije CLH kod dijabetičnih Akita/B2R-KO prije MCAO zahvata bio je značajno niži u usporedbi s nedijabetičnim B2R-KO miševima (Akita naspram Akita/B2R-KO, $P < 0,001$). Na 1. dan od MCAO zahvata broj stanica pada u B2R-KO miševa te se izjednačuje u odnosu na dijabetičnu Akita/B2R-KO skupinu (B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,05$). Na 3. dan zabilježen je značajan pad u broju stanica i kod dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa te je preostali broj stanica značajno manji u odnosu na B2R-KO skupinu (Akita/B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,05$; Akita/B2R-KO D1 naspram D3, $P < 0,01$; Akita/B2R-KO vs B2R-KO, $P < 0,001$). Broj stanica mikroglije kod dijabetičnih Akita miševa prije MCAO zahvata bio je značajno veći u usporedbi s dijabetičnim Akita/B2R-KO miševima (Akita naspram Akita/B2R-KO, $P < 0,05$). Na 1. dan nakon zahvata, kao i u ILH-u, broj stanica je bio značajno manji u usporedbi s dijabetičnim Akita/B2R-KO miševima (Akita naspram Akita/B2R-KO, $P < 0,05$), dok je na 3. dan došlo do izjednačenja. Broj stanica mikroglije u B2R-KO miševa prije MCAO zahvata bio je podjednak broju u WT miševima. Na 1. dan od zahvata nije bilo razlike, no na 3. dan je broj stanica bio značajno manji u WT miševa u usporedbi s B2R-KO skupinom (B2R-KO naspram WT, $P < 0,0001$).



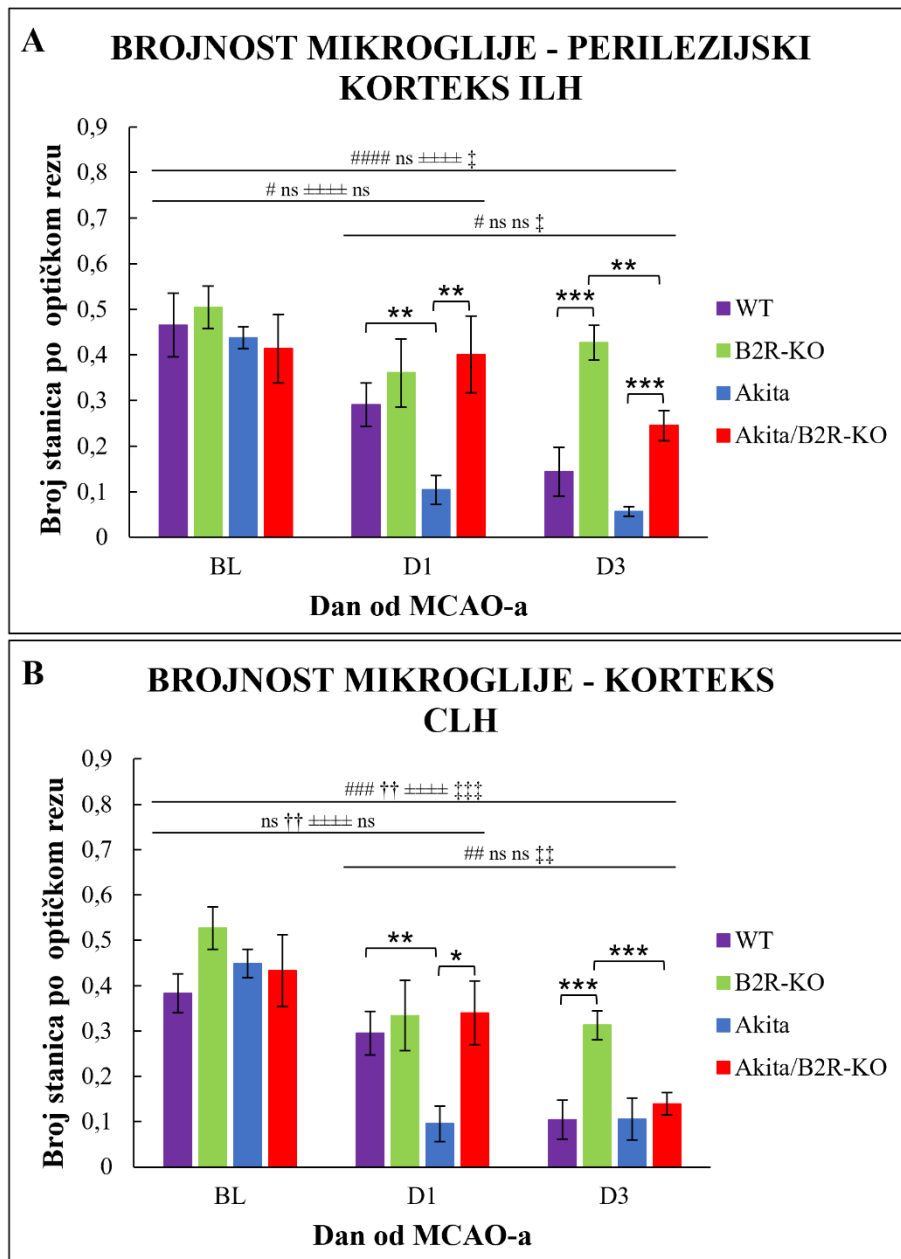
Slika 27. U hiperakutnoj i akutnoj fazi nakon MCAO zahvata dolazi do pada broja stanica mikroglije u području lezije kore ipsilateralne (ILH, A) i odgovarajućem području kontralateralne (CLH, B) moždane polutke. Navedeni pad je izraženiji u prisutnosti šećerne bolesti, a blaži kod životinja s nedostatkom bradikininog receptora tipa 2. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći mješoviti ANOVA test uz korekciju za višestruke usporedbe kontrolirajući stopu lažnog otkrivanja ($\alpha=0,05$): (*) $P<0,05$; (**) $P<0,01$; (***) $P<0,001$; (****) $P<0,0001$. Statistički značajne razlike unutar WT genotipa: (#) $P<0,05$, (##) $P<0,01$; (####) $P<0,0001$; B2R-KO genotipa: (†) $P<0,05$, (††††) $P<0,0001$; Akita genotipa: (±±) $P<0,01$; (±±±±) $P<0,0001$; Akita/B2R-KO genotipa: (‡) $P<0,05$, (‡‡) $P<0,01$, (‡‡‡) $P<0,001$. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1, D3) = 3; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1, D3) = 3; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3.

5.15.2. Postishemijski pad broja stanica mikroglije u perilezijskom području kore povećan je u prisutnosti šećerne bolesti, a smanjen u nedostatku bradikininskog receptora tipa 2

Broj stanica mikroglije u perilezijskom području kore ILH (Slika 28A) i CLH (Slika 28B) je prije MCAO zahvata bio podjednak u svim skupinama. U WT miševa je na 1. i 3. dan od MCAO zahvata došlo do značajnog pada u broju stanica mikroglije u odnosu na početno stanje (WT BL naspram D1, $P < 0,05$; WT BL naspram D3, $P < 0,0001$; WT D1 naspram D3, $P < 0,05$). U dijabetičnih Akita miševa došlo je do značajnog pada u broju stanica mikroglije na 1. dan od MCAO zahvata (ILH BL naspram D1, $P < 0,0001$), bez promjene do 3. dana. Nakon pada na 1. dan, broj preostalih stanica bio je značajno manji u dijabetičnih Akita u usporedbi s WT miševima (Akita D1 naspram WT D1, $P < 0,01$), ali se do 3 dana broj stanica u ove dvije skupine izjednačio. U B2R-KO i dijabetičnoj Akita/B2R-KO skupini u perilezijskom području kore ILH nije došlo do promjene u broju stanica mikroglije nakon MCAO zahvata, međutim na 3. dan zabilježen je značajno manji broj stanica u dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa u odnosu na B2R-KO skupinu (Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,01$). Broj stanica mikroglije u dijabetičnih Akita miševa je u obje vremenske točke nakon MCAO zahvata bio značajno manji u usporedbi s dijabetičnim Akita/B2R-KO miševima (Akita D1 naspram Akita/B2R-KO D1, $P < 0,01$; Akita D3 naspram Akita/B2R-KO D3, $P < 0,001$). Između B2R-KO i WT skupine na 1. dan od MCAO zahvata nije bilo razlike, no na 3. dan je broj stanica bio značajno manji u WT miševa (B2R-KO naspram WT, $P < 0,01$).

U istom području CLH kod WT miševa nije došlo do promjene u broju stanica mikroglije na 1. dan od MCAO zahvata, ali je na 3. dan broj stanica bio značajno manji u odnosu na početno stanje (WT D1 naspram D3, $P < 0,01$, WT BL naspram D3, $P < 0,001$). U dijabetičnih Akita miševa zabilježene su jednake promjene kao i u ILH-u, značajni pad u broju stanica mikroglije na 1. dan od MCAO zahvata (Akita BL naspram D1, $P < 0,0001$), bez daljnje promjene na 3. dan. Navedene promjene rezultirale su značajano manjim brojem stanica u dijabetičnih Akita miševa u odnosu na WT skupinu na 1. dan od MCAO zahvata (Akita naspram WT, $P < 0,01$), uz izjednačenje u broju na 3. dan. Za razliku od ILH, u CLH B2R-KO miševa došlo je do pada u broju stanica mikroglije na 1. dan (B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,05$; B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,01$), a u dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa tek na 3. dan od MCAO zahvata (Akita/B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,01$; Akita/B2R-KO D1 naspram D3; $P < 0,05$). Između Akita/B2R-KO i B2R-KO skupine, razlika se kao i u ILH-u javlja tek na 3. dan značajnim padom stanica mikroglije u dijabetičnih životinja u odnosu na kontrolu

(Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,001$). Razlika u broju stanica mikroglije među dijabetičkim skupinama u ILH-u zabilježena je i u CLH-u, ali samo na 1. dan od zahvata (Akita naspram Akita/B2R-KO, $P < 0,01$). Broj stanica mikroglije kod B2R-KO i WT miševa bio je jednak do 3. dana, kada broj preostalih stanica značajno pada u WT miševa u odnosu na B2R-KO skupinu (B2R-KO naspram WT, $P < 0,01$).



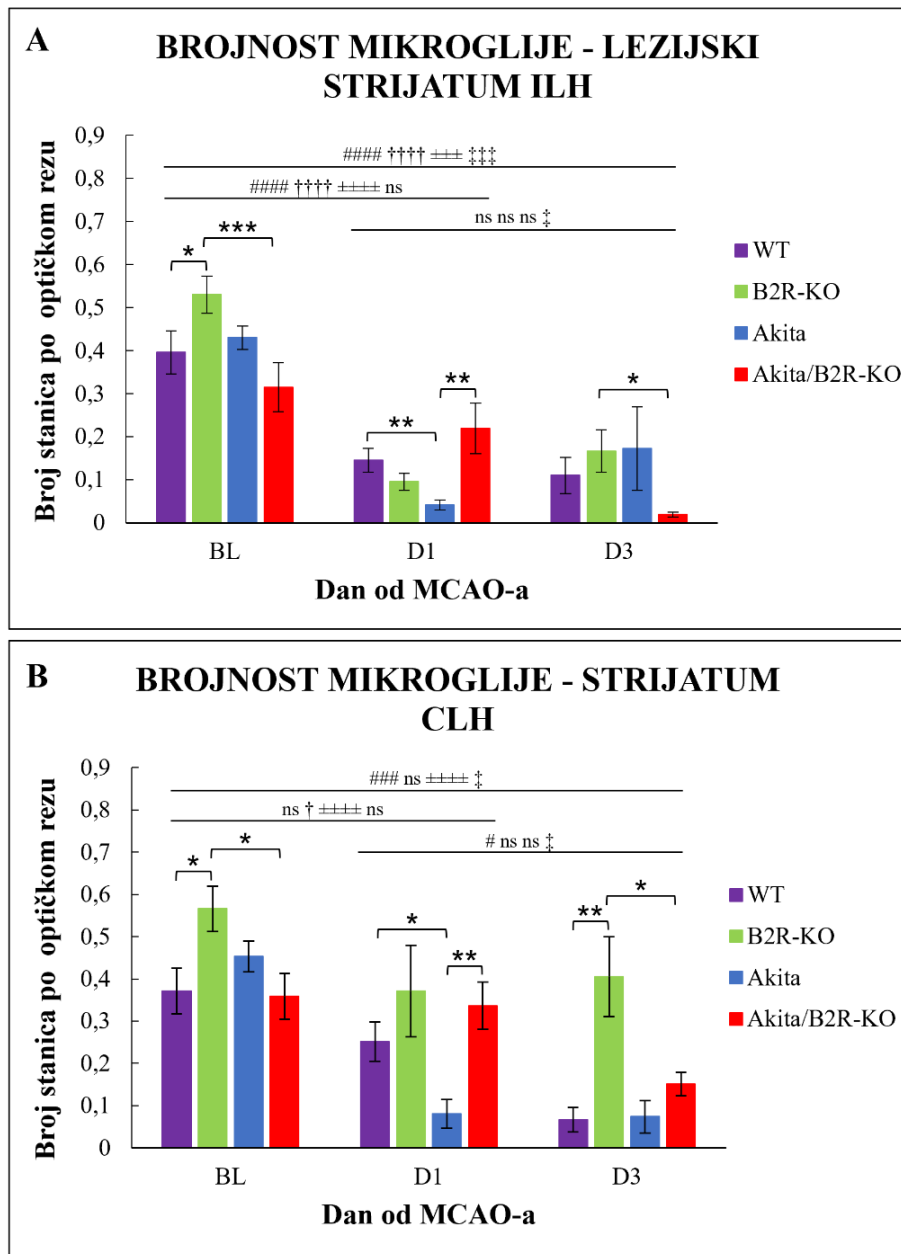
Slika 28. U hiperakutnoj i akutnoj fazi nakon MCAO zahvata dolazi do pada broja stanica mikroglije u perilezijskom području kore ipsilateralne (ILH, A) i odgovarajućem području kontralateralne (CLH, B) moždane polutke koji je izraženiji u prisutnosti šećerne bolesti, a blaži kod životinja s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći mješoviti ANOVA test uz korekciju za višestruke usporedbe kontrolirajući stopu lažnog otkrivanja ($\alpha=0,05$): (*) $P<0,05$; (**) $P<0,01$; (***) $P<0,001$. Statistički značajne razlike unutar WT genotipa: (#) $P<0,05$, (##) $P<0,01$; (###) $P<0,001$, (####) $P<0,0001$; B2R-KO genotipa: (††) $P<0,01$; Akita genotipa: (±±±±) $P<0,0001$; Akita/B2R-KO genotipa: (‡) $P<0,05$, (‡‡) $P<0,01$, (‡‡‡) $P<0,001$. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1, D3) = 3; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1, D3) = 3; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3.

5.15.3. Postishemijski pad broja stanica mikroglije u području lezije strijatuma povećan je u šećernoj bolesti, dok nedostatak bradikininog receptora tipa 2 umanjuje gubitak stanica samo u kontralateralnoj moždanoj polutci

Broj stanica mikroglije u području lezije strijatuma ILH u dijabetičnih Akita miševa prije MCAO zahvata bio je podjednak broju stanica u WT miševima (Slika 29A). U obje su skupine rezultati nakon MCAO zahvata pokazali jednake promjere kao i u lezijskom području kore, nagli gubitak stanica na 1. dan bez znakova repopulacije na 3. dan (WT BL naspram D1, $P < 0,0001$; WT BL naspram D3, $P < 0,0001$; Akita BL naspram D1, $P < 0,0001$; Akita BL naspram D3, $P < 0,001$). I u ovom području je broj stanica mikroglije kod dijabetičnih Akita miševa na 1. dan od zahvata bio značajno manji u usporedbi s WT miševima (Akita naspram WT, $P < 0,01$), no na 3. dan se ta razlika gubi. Prije MCAO zahvata, kod B2R-KO miševa zabilježen je značajno veći broj stanica mikroglije u usporedbi s dijabetičnim Akita/B2R-KO miševima (Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,001$). Prvi dan nakon MCAO zahvata došlo je do značajnog pada broja stanica mikroglije u B2R-KO miševa, vidljivog i 3. dana (B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,0001$; B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,0001$). U dijabetičnoj Akita/B2R-KO skupini je do značajnog pada došlo tek na 3. dan od MCAO zahvata (Akita/B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,001$; Akita/B2R-KO D1 naspram D3, $P < 0,01$) te je broj preostalih stanica bio značajno manji u odnosu na kontrolnu B2R-KO skupinu (Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,05$). Broj stanica mikroglije ILH dijabetičnih Akita miševa prije MCAO zahvata bio je podjednak broju u Akita/B2R-KO miševima. Na 1. dan od MCAO zahvata zabilježen je značajno manji broj stanica u dijabetičnih Akita miševa u odnosu na Akita/B2R-KO skupinu (Akita naspram B2R-KO, $P < 0,01$), no na 3. dan se ta razlika gubi. Prije MCAO zahvata B2R-KO skupina imala je veći broj stanica mikroglije od WT miševa (B2R-KO naspram WT, $P < 0,05$). Nakon MCAO zahvata padom broja stanica u obje skupine broj stanica u području lezije strijatuma se izjednačio.

U odgovarajućem području CLH-u, broj stanica mikroglije prije MCAO zahvata u dijabetičnih Akita miševa bio je podjednak broju stanica u WT miševima (Slika 29B). U prva tri dana od MCAO zahvata u WT miševa postupno dolazi do sve značajnijeg pada broja stanica (WT BL naspram D1, $P < 0,05$; WT BL naspram D3, $P < 0,0001$; WT D1 naspram D3, $P < 0,01$). U dijabetičnih Akita miševa došlo je do značajnog pada na 1. dan od MCAO zahvata bez značajne promjene 3. dana (Akita BL naspram D1, $P < 0,0001$; Akita BL naspram D3, $P < 0,0001$). Na 1. dan od MCAO zahvata je broj stanica mikroglije dijabetičnih Akita bio

značajno niži u usporedbi s WT miševima (Akita naspram WT, $P < 0,05$). Na 3. danu od MCAO zahvata nije bilo značajne razlike u broju stanica mikroglije između skupina. Kod B2R-KO miševa u usporedbi s dijabetičnim Akita/B2R-KO miševima, broj stanica je bio značajno veći prije zahvata (Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,05$). Nakon MCAO zahvata, u B2R-KO skupini došlo je do blažeg pada broja stanica već na 1. dan (B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,01$; B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,05$) što je dovelo do izjednačenja s dijabetičnom Akita/B2R-KO skupinom u kojoj nije bilo promjene na 1. dan. U dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa do značajnog pada dolazi na 3. dan (Akita/B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,01$; Akita/B2R-KO D1 naspram D3, $P < 0,01$) te preostali broj stanica postaje značajno manji u odnosu na kontrolnu B2R-KO skupinu (Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,05$). Među dijabetičnim skupinama, jednako kao i u ILH-u, postojala je razlika samo na 1. dan od MCAO zahvata, kada je broj stanica mikroglije bio značajno manji kod Akita miševa u usporedbi s Akita/B2R-KO miševima (Akita naspram Akita/B2R-KO, $P < 0,01$). B2R-KO miševi imali su značajno veći broj stanica prije zahvata u odnosu na WT miševe (B2R-KO naspram WT, $P < 0,05$). Razlika se izgubila na 1. dan, dok je na 3. dan broj stanica mikroglije značajno manji kod WT miševa u usporedbi s B2R-KO miševima (B2R-KO naspram WT, $P < 0,01$).



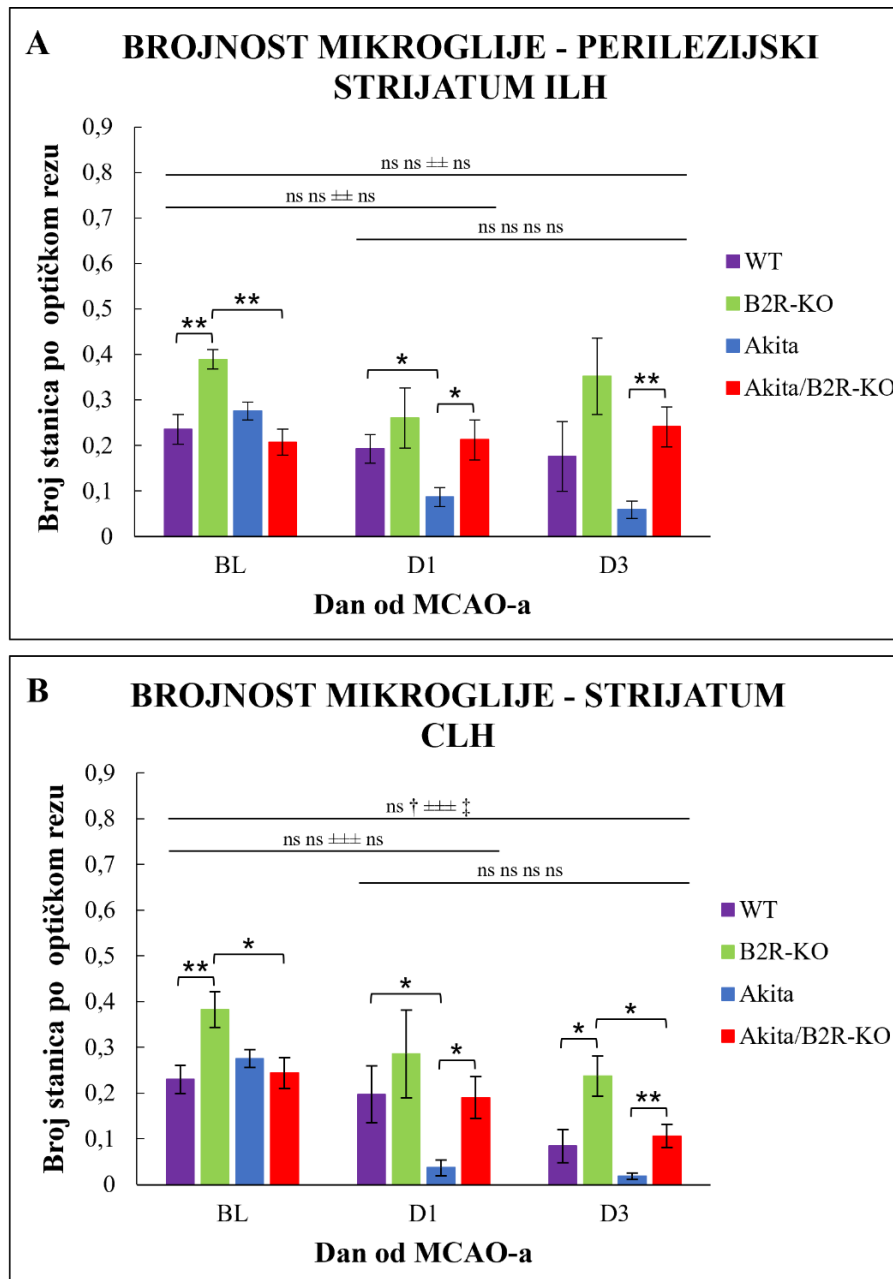
Slika 29. U prisutnosti šećerne bolesti dolazi do povećanog pada broja stanica mikroglije u području lezije strijatuma ipsilateralne (ILH, A) moždane polutke u hiperakutnoj i akutnoj fazi nakon MCAO zahvata. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 umanjuje pad broja stanica odgovarajućeg područja kontralateralne (CLH, B) moždane polutke. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći mješoviti ANOVA test uz korekciju za višestruke usporedbe kontrolirajući stopu lažnog otkrivanja ($\alpha=0,05$): (*) $P<0,05$; (**) $P<0,01$; (***) $P<0,001$. Statistički značajne razlike unutar WT genotipa: (#) $P<0,05$, (####) $P<0,001$, (#####) $P<0,0001$; B2R-KO genotipa: (†) $P<0,05$, (††††) $P<0,0001$; Akita genotipa: (++++) $P<0,001$; (++++) $P<0,0001$; Akita/B2R-KO genotipa: (‡) $P<0,05$, (‡‡‡‡) $P<0,001$. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1, D3) = 3; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1, D3) = 3; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3.

5.15.4. Postishemijski pad broja stanica mikroglije u perilezijskom području strijatuma povećan je u prisutnosti šećerne bolesti, a smanjen u nedostatku bradikininskog receptora tipa 2

U perilezijskom području strijatuma i njegovom zrcalnom području CLH (Slika 30A, B) prije MCAO zahvata zabilježen je veći broj stanica mikroglije kod B2R-KO miševa u usporedbi s dijabetičnim Akita/B2R-KO i WT miševima (Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,01$; B2R-KO naspram WT, $P < 0,01$). U 3 dana od MCAO zahvata u ILH WT miševa nije došlo do promjene u brojnosti stanica mikroglije, dok je u dijabetičnih Akita na 1. dan, jednako kao u perilezijskom području kore, broj značajno pao te ostao snižen i na 3. danu (Akita BL naspram D1, $P < 0,0001$; Akita BL naspram D3, $P < 0,0001$). Broj stanica na 1. dan od MCAO zahvata bio značajno manji u dijabetičnih Akita u odnosu na WT miševima (Akita naspram WT, $P < 0,05$). Na 3. dan se broj stanica izjednačio. U Akita/B2R-KO i B2R-KO skupini nije bilo značajne promjene u broju stanica nakon MCAO zahvata, ali se izgubila početna razlika u broju stanica mikroglije između ove dvije skupine. Kod dijabetičnih miševa je na oba dana nakon MCAO zahvata broj stanica bio značajno manji u Akita u usporedbi s Akita/B2R-KO miševima (Akita D1 naspram Akita/B2R-KO D1, $P < 0,05$; Akita D3 naspram Akita/B2R-KO D3, $P < 0,01$). S druge strane, između B2R-KO i WT miševa, unatoč početnoj razlici, nakon MCAO zahvata više nije bilo značajne razlike u brojnosti mikroglije.

U odgovarajućem području CLH-u WT miševa nakon MCAO zahvata nije bilo promjene u brojnosti. U dijabetičnim Akita miševima je kao i u ILH došlo do značajnog pada u broju stanica mikroglije na 1. dan (Akita BL naspram D1, $P < 0,0001$; Akita BL naspram D3, $P < 0,0001$). Utjecaj šećerne bolesti zabilježen je samo na 1. dan kada je broj stanica značajno manji kod dijabetičnih Akita u odnosu na WT kontrole (Akita naspram WT, $P < 0,05$). U B2R-KO miševa nakon MCAO zahvata nije došlo do promjene u broju stanica mikroglije. U dijabetičnih Akita/B2R-KO je na 3. dan došlo do pada u broju stanica (Akita/B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,01$; Akita/B2R-KO D1 naspram D3, $P < 0,05$), značajno većeg od onog u ILH-u (Akita/B2R-KO ILH D3 naspram CLH D3, $P < 0,05$). Razlika između dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa i njihovih B2R-KO kontrola se izgubila na 1. dan od zahvata, dok je na 3. dan broj preostalih stanica bio značajno manji kod dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa u usporedbi s B2R-KO miševima (B2R-KO naspram Akita/B2R-KO, $P < 0,05$). Između dijabetičnih skupina prije zahvata nije bilo razlike u brojnosti mikroglije, međutim nakon zahvata broj stanica je značajno manji kod Akita u usporedbi s Akita/B2R-KO miševima (Akita D1 naspram Akita/B2R-KO D1, $P < 0,05$; Akita D3 naspram Akita/B2R-KO D3, $P < 0,05$). Razlika između

WT i B2R-KO skupine se privremeno izgubila na 1. dan od MCAO zahvata, dok je na 3. dan broj stanice mikroglije bio značajno manji u WT miševa u usporedbi s B2R-KO miševima (B2R-KO naspram WT, $P < 0,05$).



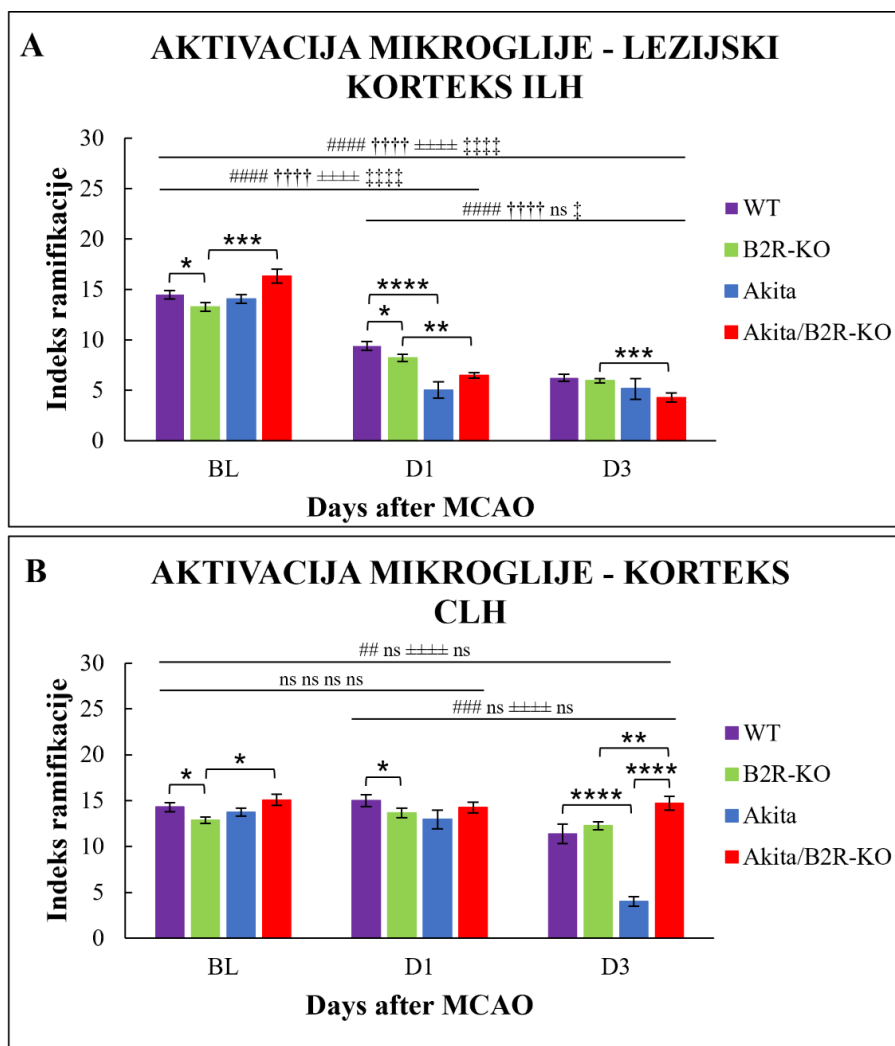
Slika 30. U hiperakutnoj i akutnoj fazi nakon MCAO zahvata dolazi do pada broja stanica mikroglije u perilezijskom području strijatuma ipsilateralne (ILH, A) i odgovarajućem području kontralateralne (CLH, B) moždane polutke. Navedeni pad je izraženiji u prisutnosti šećerne bolesti, a blaži kod životinja s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći mješoviti ANOVA test uz korekciju za višestruke usporedbe kontrolirajući stopu lažnog otkrivanja ($\alpha=0,05$): (*) $P<0,05$; (**) $P<0,01$. Statistički značajne razlike unutar B2R-KO genotipa: (†) $P<0,05$; Akita genotipa: ($\pm\pm$) $P<0,01$; ($\pm\pm\pm$) $P<0,001$; Akita/B2R-KO genotipa: (\ddagger) $P<0,05$. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1, D3) = 3; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1, D3) = 3; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3.

5.15.5. U području lezije kore postishemijska promjena morfologije i aktivacija stanica mikroglije izraženija je u šećernoj bolesti i u miševa s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2

Indeks ramifikacije stanica mikroglije u području lezije kore ILH (Slika 31A) u dijabetičnih Akita miševa prije MCAO zahvata (BL) bio je podjednak onom u WT miševima. Prvi dan od MCAO zahvata kao posljedica ishemije došlo je do značajne promjene u indeksu ramifikacije i aktivacije stanica mikroglije i u WT i u dijabetičnih Akita miševa bez dodatne promjene na 3. dan (WT BL naspram D1, $P < 0,0001$; WT BL naspram D3, $P < 0,0001$; Akita BL naspram D1, $P < 0,0001$; Akita BL naspram D3, $P < 0,0001$). Indeks ramifikacije Akita skupine je na 1. dan bio značajno niži u odnosu na WT skupinu (Akita naspram WT, $P < 0,0001$), ali se do 3. dana izjednačio. Kod dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa prije MCAO zahvata indeks ramifikacije bio je značajno viši u usporedbi s nedijabetičnim B2R-KO miševima (B2R-KO naspram Akita/B2R-KO, $P < 0,001$). U B2R-KO miševa je u prva 3 dana nakon MCAO zahvata došlo do sve značajnijeg smanjenja indeksa ramifikacije, ukazujući na progresivno veće aktivacijsko stanje (B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,0001$; B2R-KO D1 naspram D3, $P < 0,0001$; B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,0001$). U dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa indeks ramifikacije se značajno smanjio na 1. dan od MCAO zahvata te je ostao snižen do 3. dana (Akita/B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,0001$). U obje vremenske točke nakon zahvata indeks ramifikacije bio je značajno niži u dijabetičnoj Akita/B2R-KO skupini u odnosu na kontrolnu B2R-KO skupinu što ukazuje na značajno jaču aktivaciju stanica (Akita/B2R-KO D1 naspram B2R-KO D1, $P < 0,01$; Akita/B2R-KO D3 naspram B2R-KO D3, $P < 0,001$). Indeks ramifikacije mikroglije se u dijabetičnih Akita i Akita/B2R-KO miševa prije MCAO zahvata nije razlikovao te ostaje podjednak u vremenskim točkama nakon zahvata uz značajnu aktivaciju stanica u obje skupine. Indeks ramifikacije mikroglije u B2R-KO miševa prije MCAO zahvata bio je značajno niži od onog u WT miševima (B2R-KO naspram WT, $P < 0,05$). Razlika u indeksu ramifikacije i aktivacijskom statusu zadržala se samo do 1. dana od MCAO zahvata (B2R-KO naspram WT, $P < 0,05$).

Unatoč jednakom indeksu ramifikacije i aktivacijskom stanju kao u ILH-u prije zahvata, u CLH-u su nakon zahvata primijećene značajno drugačije promjene (Slika 31B). U WT i dijabetičnoj Akita skupini 1. dan nije bilo promjene, a do pada u indeksu ramifikacije je u obje skupine došlo na 3. dan od zahvata (WT BL naspram D3, $P < 0,01$; Akita BL naspram D3, $P < 0,0001$). Indeks ramifikacije je na 3. dan bio značajno niži kod dijabetičnih Akita miševa u odnosu na WT miševima (Akita naspram WT, $P < 0,0001$). U Akita/B2R-KO i B2R-KO skupini

nije došlo do promjene indeksa ramifikacije i aktivacije stanica mikroglije nakon MCAO zahvata u ovom području. Početna razlika u indeksu ramifikacije između ove dvije skupine se privremeno izgubila 1. dan od MCAO zahvata, ali je već na 3. dan indeks ramifikacije ponovno bio značajno viši kod dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa u odnosu na kontrolne B2R-KO miševe, Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,01$). Indeks ramifikacije dijabetičnih Akita miševa u CLH-u je 3. dan bio značajno niži u odnosu na dijabetične Akita/B2R-KO miševe (Akita naspram Akita/B2R-KO, $P < 0,0001$). Unatoč nižem indeksu ramifikacije, odnosno jačoj aktivaciji stanica mikroglije u B2R-KO miševa naspram WT miševa prije zahvata i na 1. dan nakon zahvata (B2R-KO BL naspram WT BL, $P < 0,05$; B2R-KO D1 naspram WT D1, $P < 0,05$), 3. dan od zahvata nije bilo razlike među skupinama.



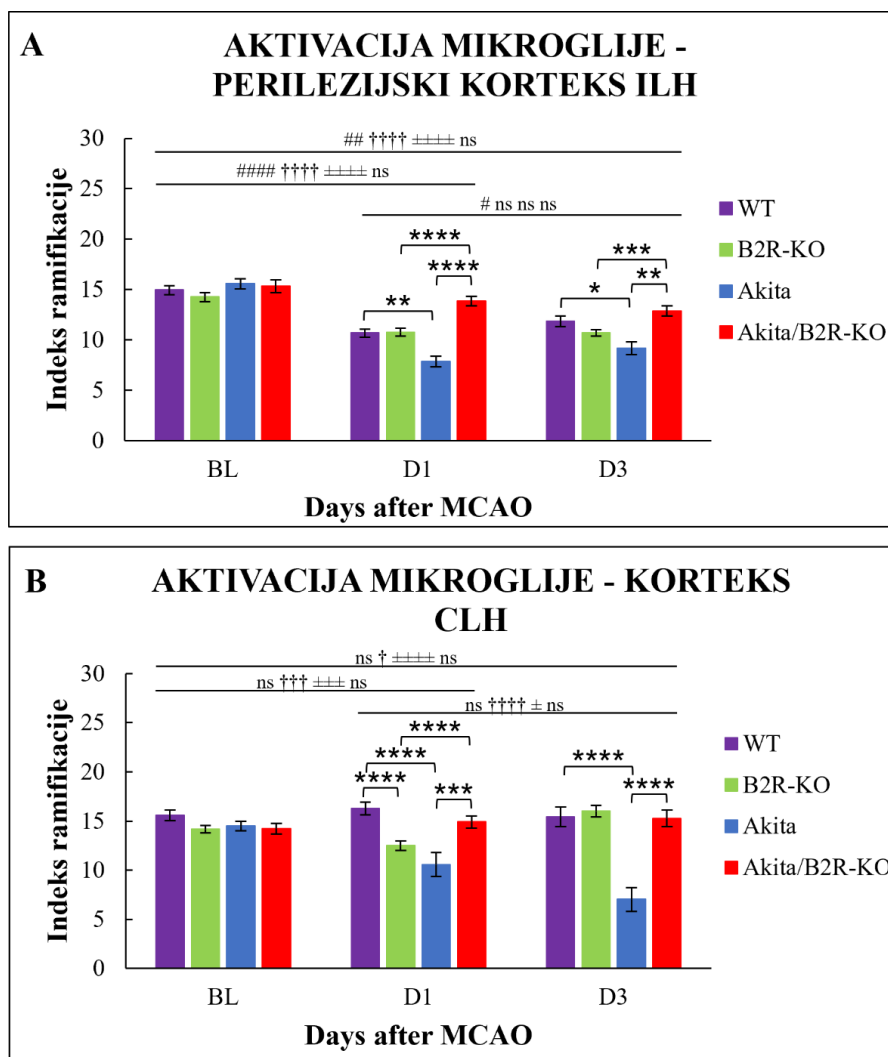
Slika 31. U hiperakutnoj i akutnoj fazi od MCAO zahvata dolazi do značajne promjene u morfologiji i aktivaciji stanica mikroglije u području lezije kore ipsilateralne (ILH, A) i odgovarajućem području kontralateralne (CLH, B) moždane polutke, koja je izraženija u prisutnosti šećerne bolesti i u nedijabetičkih životinja s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći mješoviti ANOVA test uz korekciju za višestruke usporedbe kontrolirajući stopu lažnog otkrivanja ($\alpha=0,05$): (*) $P<0,05$; (**) $P<0,01$; (***) $P<0,001$; (****) $P<0,0001$. Statistički značajne razlike unutar WT genotipa: (##) $P<0,01$, (###) $P<0,001$, (####) $P<0,0001$; B2R-KO genotipa: (††††) $P<0,0001$; Akita genotipa: (±±±±) $P<0,0001$; Akita/B2R-KO genotipa: (‡) $P<0,05$, (‡‡‡‡) $P<0,0001$. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1, D3) = 3; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1, D3) = 3; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3.

5.15.6. U perilezijskom području kore nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 ublažava izrazitu postishemijsku promjenu morfologije i aktivaciju stanica mikroglije u šećernoj bolesti

Indeks ramifikacije mikroglije u perilezijskom području kore ILH (Slika 32A) nije se razlikovao među skupinama prije zahvata. U WT i dijabetičnih Akita miševa je nakon ishemije i u ovom području došlo do promjene u morfologiji i aktivacije mikroglije, vidljivog iz značajno nižeg indeksa ramifikacije na 1. i na 3. dan od zahvata u odnosu na početno stanje (WT BL naspram D1, $P < 0,0001$; WT BL naspram D3, $P < 0,001$, Akita BL naspram D1, $P < 0,0001$; Akita BL naspram D3, $P < 0,0001$). U obje vremenske točke nakon MCAO zahvata indeks ramifikacije u Akita miševa bio je značajno niži u odnosu na WT miševa (Akita D1 naspram WT D1, $P < 0,01$; Akita D3 naspram WT D3, $P < 0,05$). U B2R-KO miševa je također na 1. dan od MCAO zahvata došlo do značajnog smanjenja indeksa ramifikacije i aktivacije mikroglije, bez promjene na 3. dan (B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,0001$). Međutim, u dijabetičnoj Akita/B2R-KO skupini nije došlo do promjene indeksa ramifikacije i aktivacije stanica mikroglije nakon MCAO zahvata u ovom području. S toga je indeks ramifikacije na oba dana nakon zahvata bio značajno niži u B2R-KO miševa u odnosu na dijabetičnu Akita/B2R-KO skupinu (Akita/B2R-KO D1 naspram B2R-KO D1, $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO D3 naspram B2R-KO D3, $P < 0,001$). Uspoređujući dijabetične skupine, indeks ramifikacije mikroglije je u Akita miševa nakon MCAO zahvata bio značajno niži u odnosu na Akita/B2R-KO miševa (Akita/B2R-KO D1 naspram Akita D1, $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO D3 naspram Akita D3, $P < 0,01$). Indeks ramifikacije mikroglije u B2R-KO miševa nakon zahvata nije se razlikovao od onog u WT miševa.

Unatoč jednakom indeksu ramifikacije i početnom aktivacijskom stanju kao u ILH-u, u CLH-u su nakon MCAO zahvata primijećene značajno drugačije promjene (Slika 32B). U WT miševa u ovom području nije došlo do promjena u indeksu ramifikacije za razliku od dijabetičnih Akita miševa u kojima je već na 1. dan došlo do značajnog smanjenja indeksa ramifikacije i aktivacije stanica mikroglije koja se održala do 3. dana (Akita BL naspram D1, $P < 0,001$, Akita BL naspram D3, $P < 0,0001$). Indeks ramifikacije u obje vremenske točke nakon zahvata, u CLH-u Akita miševa bio značajno niži u odnosu na WT i Akita/B2R-KO miševa (Akita D1 naspram WT D1, $P < 0,0001$; Akita D3 naspram WT D3, $P < 0,0001$). U B2R-KO miševa je 1. dan od zahvata došlo do privremenog smanjenja indeksa ramifikacije, koji se do 3. dana vratio na početnu vrijednost (B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,001$; B2R-KO D1 naspram D3, $P < 0,0001$), dok u dijabetičnoj Akita/B2R-KO skupini, kao i u ILH-u, nije bilo promjene u

odnosu na početno stanje. Zbog toga je indeks ramifikacije bio značajno viši u dijabetičnoj Akita/B2R-KO skupini u odnosu na B2R-KO kontrole na 1. dan, te u odnosu na dijabetične Akita miševe na oba dana nakon zahvata (B2R-KO D1 naspram Akita/B2R-KO D1, $P < 0,001$; Akita D1 naspram Akita/B2R-KO D1, $P < 0,001$; Akita D3 naspram Akita/B2R-KO D3, $P < 0,0001$). Između B2R-KO i WT skupine na 1. dan uočena je privremena razlika u indeksu ramifikacije, značajno nižim indeksom u B2R-KO miševa u odnosu na WT miševe (B2R-KO D1 naspram WT D1, $P < 0,0001$).



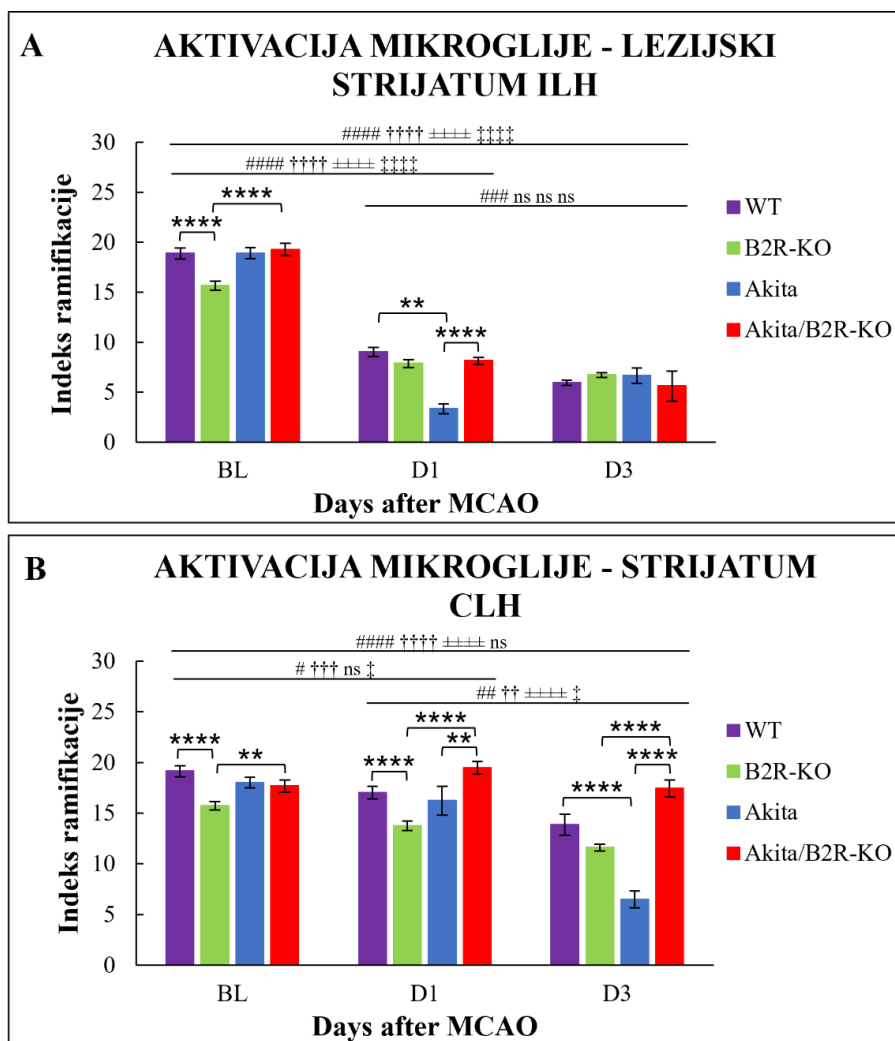
Slika 32. U hiperakutnoj i akutnoj fazi od MCAO zahvata nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 smanjuje promjenu u morfologiji i aktivaciju stanica mikroglije u perilezijskom području kore ipsilateralne (ILH, A) i odgovarajućem području kontralateralne (CLH, B) moždane polutke dijabetičnih životinja. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći mješoviti ANOVA test uz korekciju za višestruke usporedbe kontrolirajući stopu lažnog otkrivanja ($\alpha=0,05$): (*) $P<0,05$; (**) $P<0,01$; (***) $P<0,001$ (****) $P<0,0001$. Statistički značajne razlike unutar WT genotipa: (#) $P<0,05$, (##) $P<0,01$, (####) $P<0,0001$; B2R-KO genotipa: (†) $P<0,05$, (†††) $P<0,001$, (††††) $P<0,0001$; Akita genotipa: (\pm) $P<0,05$, ($\pm\pm\pm$) $P<0,001$; ($\pm\pm\pm\pm$) $P<0,0001$. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1, D3) = 3; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1, D3) = 3; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3.

5.15.7. U području lezije strijatuma nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 ublažava postishemijsku promjenu u morfologiji i aktivaciju stanica mikroglije dijabetičnih životinja, ali je potiče u kontralateralnoj polutki nedijabetičnih životinja

U području lezije strijatuma ILH indeks ramifikacije stanica mikroglije (Slika 33A) u dijabetičnih Akita miševa prije MCAO zahvata bio je podjednak onom u WT miševima. Nakon MCAO zahvata, u obje skupine je 1. dan, kao i u području lezije kore, došlo do značajnog smanjenja indeksa ramifikacije i aktivacije stanica mikroglije u odnosu na početno stanje koje se zadržalo do 3. dana (WT BL naspram D1, $P < 0,0001$; WT BL naspram D3, $P < 0,0001$; Akita BL naspram D1, $P < 0,0001$; Akita BL naspram D3, $P < 0,0001$). Prvi dan od zahvata indeks ramifikacije bio je značajno niži u dijabetičnih Akita miševa u usporedbi s WT kontrolnom skupinom (Akita naspram WT, $P < 0,0001$), no do 3. dana se razlika izgubila. Kod dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa prije MCAO zahvata indeks ramifikacije bio je značajno viši u usporedbi s nedijabetičnim B2R-KO miševima (B2R-KO naspram Akita/B2R-KO, $P < 0,0001$). U obje se skupine indeks ramifikacije značajno snizio nakon MCAO zahvata (B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,0001$; B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,0001$), ali bez značajne promjene nakon 1. dana. Nakon zahvata, više nije bilo razlike u indeksu ramifikacije između ove dvije skupine. Indeks ramifikacije mikroglije kod dijabetičnih Akita i Akita/B2R-KO miševa se nije razlikovao prije MCAO zahvata. Prvi dan nakon zahvata stanice mikroglije u Akita miševa bile su značajno jače aktivirane, značajno nižeg indeksa ramifikaciju u usporedbi s Akita/B2R-KO miševima (Akita naspram Akita/B2R-KO, $P < 0,001$), no na 3. dan više nije bilo razlike među skupinama. Indeks ramifikacije mikroglije u B2R-KO miševa prije MCAO zahvata bio je značajno niži od onog u WT miševima (B2R-KO naspram WT, $P < 0,0001$). Nakon zahvata, obje su skupine imale podjednako smanjenje indeksa ramifikacije i aktivaciju stanica.

Unatoč jednakom početnom aktivacijskom stanju kao u ILH-u, u CLH-u su nakon zahvata primijećene značajno drugačije promjene među skupinama (Slika 33B). U WT i Akita miševa na 1. dan od zahvata nije bilo promjene, ali je na 3. dan došlo do značajnog smanjenja indeksa ramifikacije u odnosu na prethodne vremenske točke (WT BL naspram D3, $P < 0,0001$; WT D1 naspram D3, $P < 0,01$; Akita BL naspram D3, $P < 0,0001$; Akita D1 naspram D3, $P < 0,0001$). Na 1. dan nije bilo razlike između skupina, no na 3. dan od zahvata indeks ramifikacije bio je značajno niži u dijabetičnih Akita miševa u odnosu na WT miševima (Akita naspram WT, $P < 0,0001$) što ukazuje na jaču aktivaciju stanica mikroglije. U B2R-KO skupini

je također došlo do smanjenja indeksa ramifikacije nakon 1. dan od zahvata (B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,001$; B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,0001$), dok su kod dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa stanice mikroglije nakon zahvata ostale u mirujućem stanju te se njihov indeks ramifikacije nije mijenjao. Zbog toga je indeks ramifikacije u toj skupini i nakon zahvata ostao značajno viši u odnosu na B2R-KO miševe (Akita/B2R-KO BL naspram B2R-KO BL, $P < 0,01$; Akita/B2R-KO D1 naspram B2R-KO D1, $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO D3 naspram B2R-KO D3, $P < 0,0001$). Indeks ramifikacije dijabetičnih Akita miševa u CLH-u je nakon zahvata bio značajno niži u odnosu na dijabetične Akita/B2R-KO miševe (Akita D1 naspram Akita/B2R-KO D1, $P < 0,01$; Akita D3 naspram Akita/B2R-KO D3, $P < 0,0001$). Unatoč jačoj aktivaciji stanica i značajno nižem indeksu ramifikacije mikroglije u B2R-KO miševa u odnosu na WT miševe prije zahvata i na 1. dan nakon zahvata (B2R-KO BL naspram WT BL, $P < 0,0001$; B2R-KO D1 naspram WT D1, $P < 0,0001$), 3. dan od zahvata nije bilo razlike u aktivacijskom statusu među skupinama.



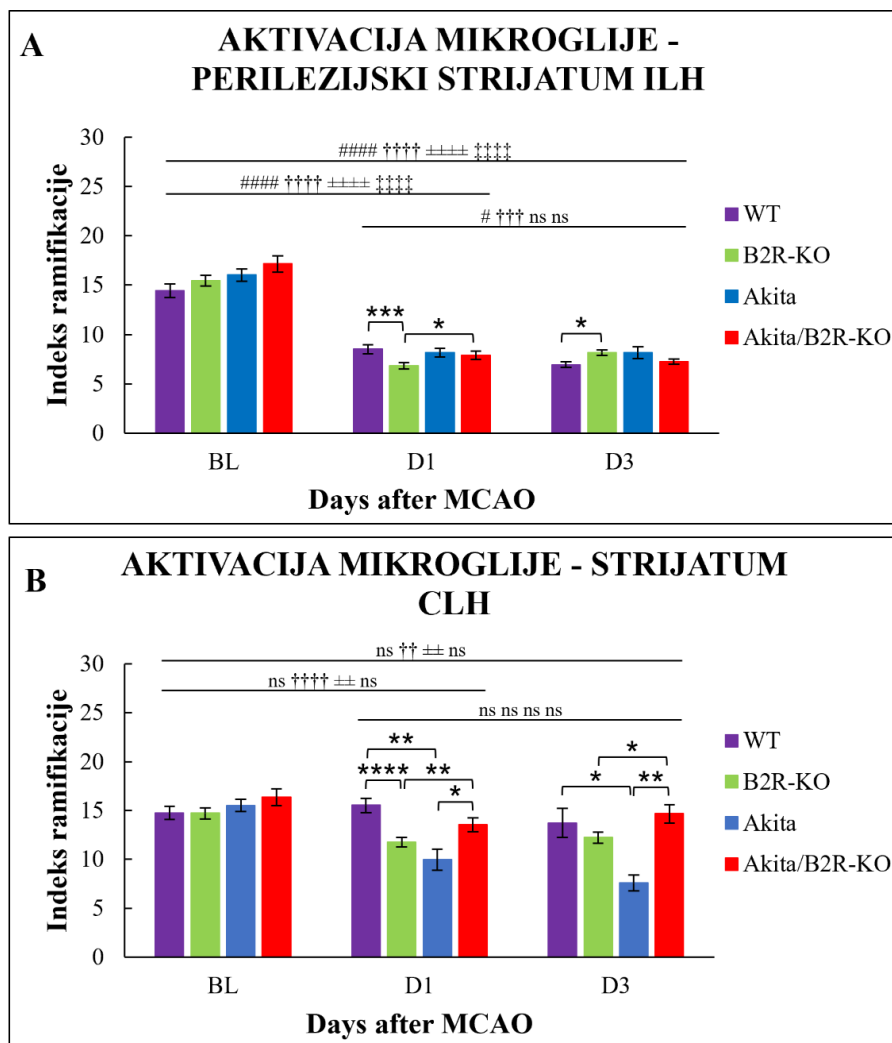
Slika 33. U šećernoj bolesti nedostatak bradikininog receptora tipa 2 smanjuje promjenu u morfologiji i aktivaciju stanica mikroglije u području lezije strijatuma ipsilateralne (ILH, A) i odgovarajućem području kontralateralne (CLH, B) moždane polutke u hiperakutnoj i akutnoj fazi od MCAO zahvata. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći mješoviti ANOVA test uz korekciju za višestruke usporedbe kontrolirajući stopu lažnog otkrivanja ($\alpha=0,05$): (***) $P<0,001$ (****) $P<0,0001$. Statistički značajne razlike unutar WT genotipa: (#) $P<0,05$, (##) $P<0,01$, (####) $P<0,0001$; B2R-KO genotipa: (††) $P<0,01$, (†††) $P<0,001$, (††††) $P<0,0001$; Akita genotipa: (±±±±) $P<0,0001$; Akita/B2R-KO genotipa: (‡) $P<0,05$, (‡‡‡‡) $P<0,0001$. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1, D3) = 3; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1, D3) = 3; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3.

5.15.8. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 sprječava izrazitu postishemijsku promjenu morfologije i aktivaciju stanica mikroglije u zrcalnom kontralateralnom području perilezijskog strijatuma dijabetičkih miševa

U perilezijskom području strijatuma ILH indeks ramifikacije stanica mikroglije (Slika 34) nije se razlikovao među skupinama prije MCAO zahvata. U WT i Akita skupini indeks ramifikacije je u obje vremenske točke nakon zahvata bio značajno snižen u odnosu na početno stanje (WT BL naspram D1, $P < 0,0001$; WT BL naspram D3, $P < 0,0001$; Akita BL naspram D1, $P < 0,0001$; Akita BL naspram D3, $P < 0,0001$). U B2R-KO skupini je nakon zahvata došlo do značajnog smanjenja indeksa ramifikacije i aktivacije stanica mikroglije na 1. dan te blage stabilizacije na 3. dan (B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,0001$; B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,0001$; B2R-KO D1 naspram D3, $P < 0,001$). U dijabetičkih Akita/B2R-KO miševa je također došlo do značajnog smanjenja indeksa ramifikacije na 1. dan od zahvata, ali su stanice mikroglije ostale u istom aktivacijskom stanju do 3. dana (Akita/B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,0001$). Prvi dan nakon MCAO zahvata indeks ramifikacije za B2R-KO skupinu bio je značajno niži u odnosu na Akita/B2R-KO i WT skupinu (Akita/B2R-KO naspram B2R-KO, $P < 0,05$; WT naspram B2R-KO, $P < 0,001$), no 3. dan dolazi do promjene padom indeksa ramifikacije u WT skupini u odnosu na B2R-KO skupinu (WT naspram B2R-KO, $P < 0,05$). Među ostalim skupinama nije bilo razlike u aktivacijskom statusu mikroglije nakon izazivanja ishemije.

U perilezijskom području strijatuma CLH unatoč jednakom početnom aktivacijskom stanju kao u ILH-u, nakon zahvata su primijećene značajno drugačije promjene među skupinama (Slika 34B). U B2R-KO i Akita skupini je kao i u ILH-u došlo je do smanjenja indeksa ramifikacije na 1. dan od zahvata bez daljnje promjene na 3. dan (B2R-KO BL naspram D1, $P < 0,001$; B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,001$; Akita BL naspram D1, $P < 0,001$; Akita BL naspram D3, $P < 0,001$). U WT i dijabetičkih Akita/B2R-KO miševa nije došlo do promjene u indeksu ramifikacije i aktivaciji stanica mikroglije nakon zahvata. Stoga je u obje vremenske točke nakon MCAO zahvata, u CLH-u Akita miševa indeks ramifikacije bio značajno niži u odnosu na WT i dijabetične Akita/B2R-KO miševe (Akita D1 naspram WT D1, $P < 0,01$; Akita D3 naspram WT D3, $P < 0,05$; Akita D1 naspram Akita/B2R-KO D1, $P < 0,05$; Akita D3 naspram Akita/B2R-KO D3, $P < 0,01$). U B2R-KO miševa je 1. dan nakon MCAO zahvata indeks ramifikacije u CLH-u također bio značajno niži u odnosu na Akita/B2R-KO i WT miševe (B2R-KO naspram WT, $P < 0,0001$; B2R-KO naspram Akita/B2R-KO, $P < 0,01$), no na

3. dan razlika se održala samo među Akita/B2R-KO i B2R-KO skupinama (B2R-KO naspram Akita/B2R-KO, $P < 0,05$).



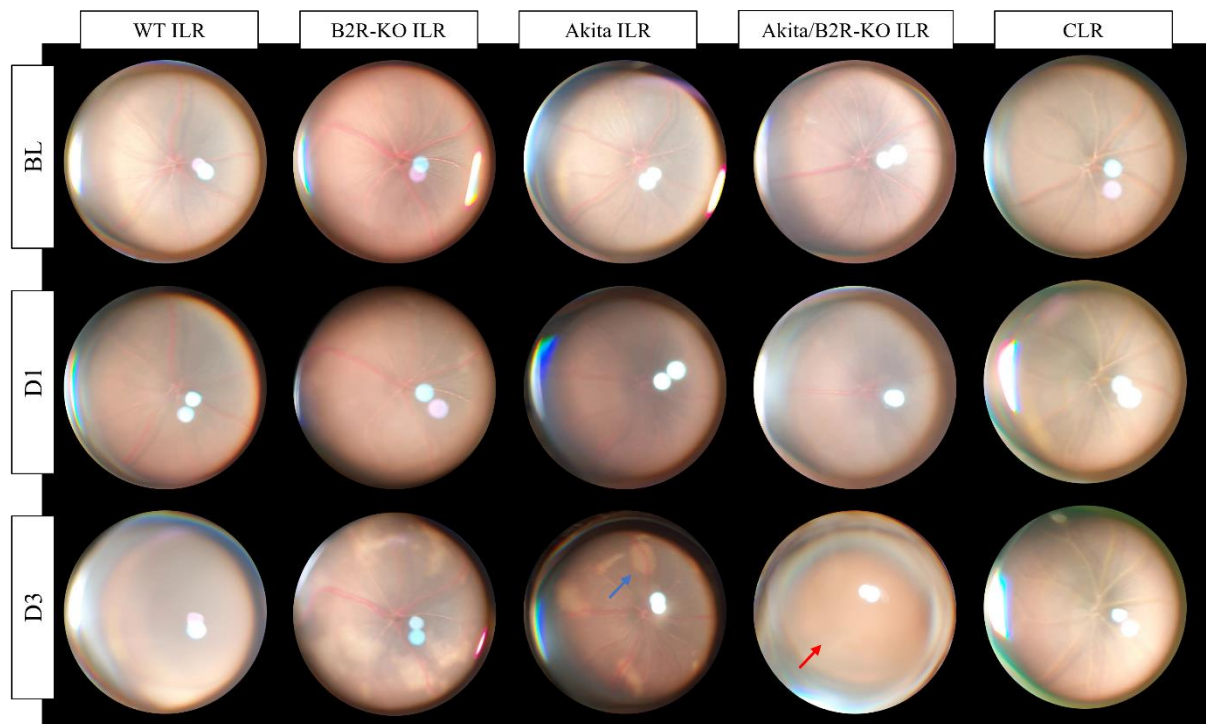
Slika 34. Šećerna bolest ne utječe na aktivaciju stanica mikroglije u perilezijskom području strijatuma ipsilateralne (ILH, A) moždane polutke, a nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 sprječava promjenu morfologije i aktivaciju stanica mikroglije kontralateralne (CLH, B) moždane polutke dijabetičkih životinja. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći mješoviti ANOVA test uz korekciju za višestruke usporedbe kontrolirajući stopu lažnog otkrivanja ($\alpha=0,05$): (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$; (***) $P < 0,001$ (****) $P < 0,0001$. Statistički značajne razlike unutar WT genotipa: (#) $P < 0,05$, (####) $P < 0,0001$; B2R-KO genotipa: (††) $P < 0,01$, (†††) $P < 0,001$, (††††) $P < 0,0001$; Akita genotipa: (±±) $P < 0,01$, (±±±±) $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO genotipa: (‡‡‡‡) $P < 0,0001$. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1, D3) = 3; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1, D3) = 3; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3.

5.16. Utjecaj šećerne bolesti i nedostatka bradikinskog receptora tipa 2 na status očne pozadine nakon MCAO zahvata

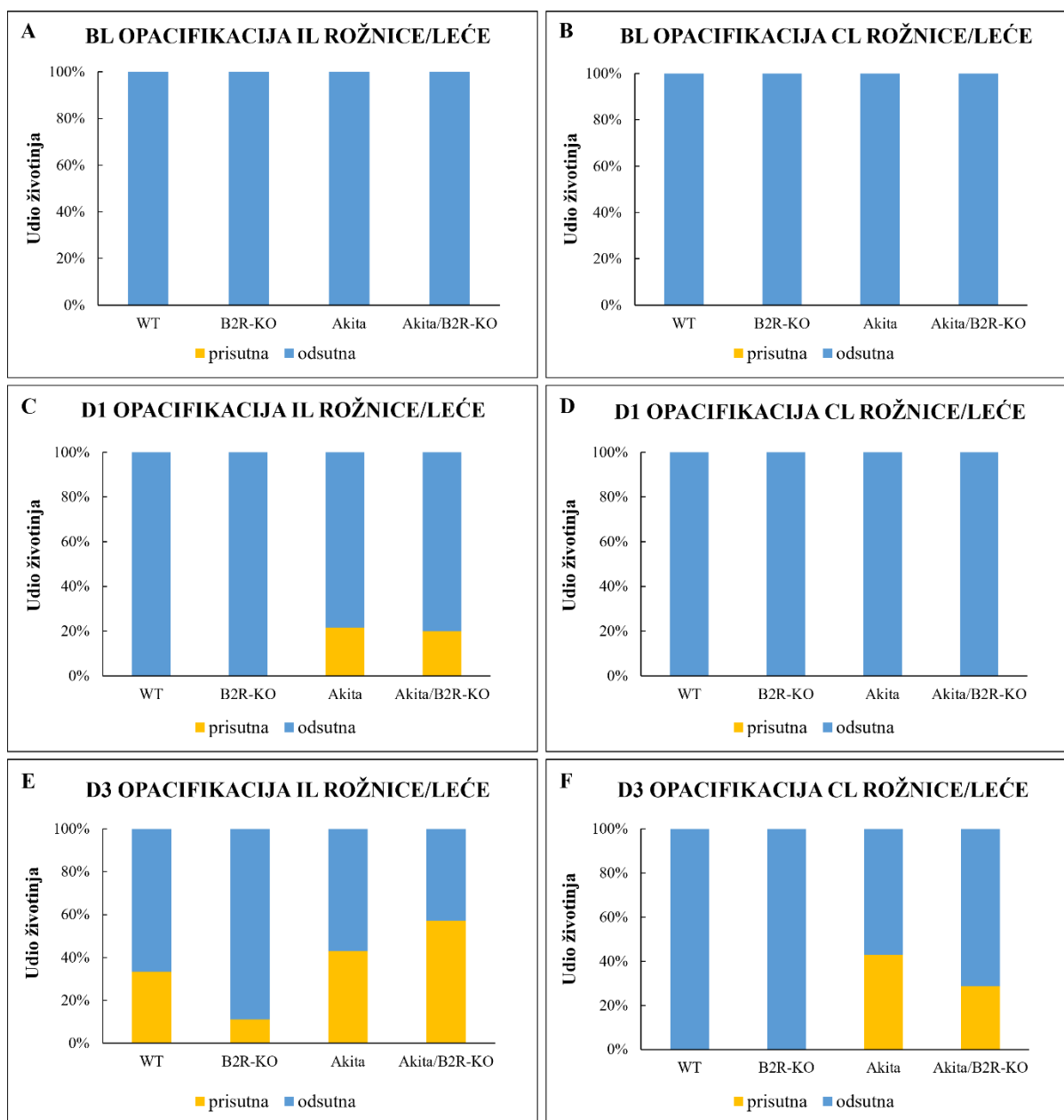
U svrhu određivanja utjecaja šećerne bolesti i nedostatka B2R-a na status očne pozadine prije i nakon izazivanja ishemije analizirane su fotografije očne pozadine ipsilateralnog i kontralateralnog oka prema kriteriju postojanja karakterističnih opacifikacija mrežnice kao jasnih znakova ishemijske onkotske nekroze prije te 1. i 3. dana nakon MCAO zahvata (Slika 35, plava strelica). Na istim je fotografijama dodatno, kao moguća komplikacija ishemije prednjeg segmenta oka, analizirana pojava opacifikacije rožnice i/ili leće u slučaju koje nije bilo moguće analizirati nalaz očne pozadine (Slika 35, crvena strelica). Na fotografijama zabilježenima prije MCAO zahvata ni kod jedne životinje nije uočena opacifikacija rožnice/leće (Slika 36A, B), kao ni prisutnost opacifikacija mrežnice (Slika 37A, B). Na 1. dan od MCAO zahvata, 21,4% miševa iz Akita skupine pokazivalo je opacifikaciju IL rožnice/leće (Slika 36C), a 14,3% vidljive opacifikacije ipsilateralne mrežnice (engl. *ipsilateral retina* – ILR) (Slika 37C), za razliku od WT skupine u kojoj nije bilo opacifikacije IL rožnice/leće (Slika 36C), ali je 33,3% miševa razvilo opacifikacije ILR (Slika 37C). Na isti dan, 20% miševa iz Akita/B2R-KO skupine pokazivalo je opacifikaciju IL rožnice/leće (Slika 36C), a 6% vidljive opacifikacije ILR (Slika 37C) za razliku od nedijabetične B2R-KO skupine u kojoj je 40% miševa razvilo vidljive opacifikacije ILR (Slika 37C), bez opacifikacije rožnice/leće (Slika 36C). Na 1. dan od zahvata 9% više životinja iz Akita skupine pokazivalo je znakove ishemije u odnosu na Akita/B2R-KO skupinu, dok je u B2R-KO skupini 6% više životinja razvilo znakove ishemije u usporedbi s WT skupinom (Slika 37C). Nijedna životinja iz analiziranih skupina na 1. dan od MCAO-a nije razvila opacifikaciju CL rožnice/leće (Slika 36D), kao ni znakove opacifikacije kontralateralne mrežnice (engl. *contralateral retina* – CLR) (Slika 37D).

Na 3. dan od MCAO zahvata, 42,9% miševa iz Akita skupine razvilo je opacifikaciju IL rožnice/leće (Slika 36E), a 57,1% vidljive opacifikacije ILR (Slika 37E), za razliku od WT skupine, u kojoj je 33,3% miševa razvilo opacifikaciju IL rožnice/leće (Slika 36E), a 50% vidljive opacifikacije ILR (Slika 37E). Na isti je dan 57,1% miševa iz Akita/B2R-KO skupine razvilo opacifikaciju IL rožnice/leće (Slika 36E), dok su kod 14,3% bile vidljive opacifikacije ILR (Slika 37E), za razliku od nedijabetične B2R-KO skupine, u kojoj je 88,9% miševa razvilo vidljive opacifikacije ILR (Slika 37E), a samo 11,1% opacifikaciju IL rožnice/leće (Slika 36E). Na 3. dan od zahvata 28,6% više životinja iz Akita skupine pokazivalo je znakove ishemije u odnosu na Akita/B2R-KO skupinu, dok je u B2R-KO skupini 16,6% više životinja razvilo

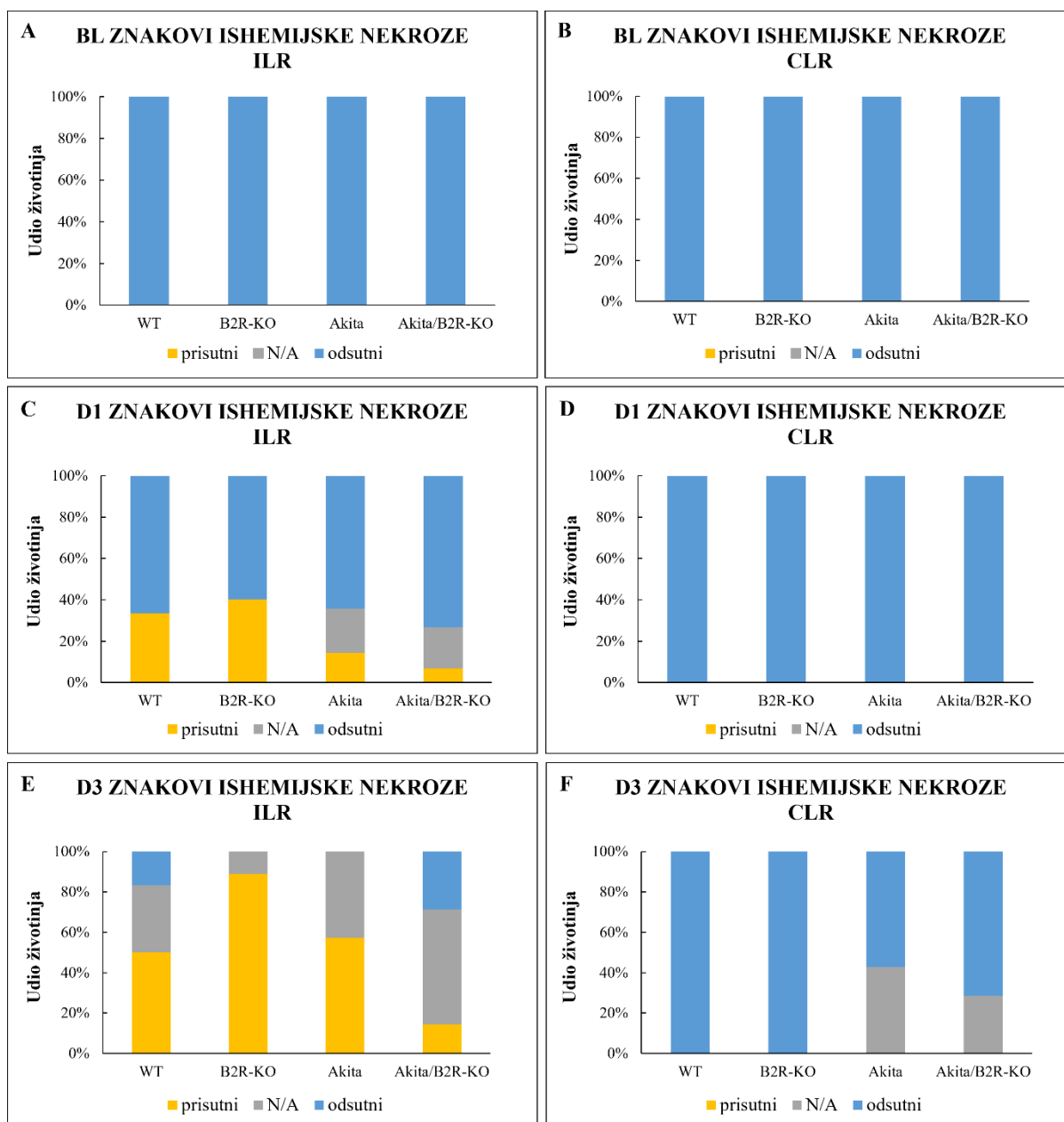
znakove ishemije u usporedbi s WT skupinom (Slika 37E). Opacifikaciju CL rožnice/leće je na 3. dan od MCAO zahvata razvilo 42,9% životinja Akita skupine te 28,6% životinja Akita/B2R-KO skupine, ali je nije razvila nijedna životinja iz B2R-KO i WT skupina (Slika 36E). Vidljivih opacifikacija CLR na 3. dan od MCAO-a nije bilo ni u jednoj skupini životinja (Slika 37F).



Slika 35. Reprezentativne slike očne pozadine prikazuju ipsilateralne mrežnice (ILR) prije i nakon MCAO zahvata kod dijabetičkih Akita i Akita/B2R-KO miševa te njihovih B2R-KO i WT nedijabetičnih kontrola. U dijelu prikazanih ipsilateralnih mrežnica prisutni su znakovi ishemijske nekroze mrežnice (plava strelica), a vidljivi su i primjeri u kojima jasna analiza očne pozadine nije moguća uslijed opacifikacije rožnice/leće (crvena strelica). Desni stupac prikazuje primjer kontralateralne mrežnice (CLR). Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa: WT, miševi divljeg tipa; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2; Akita, dijabetični miševi; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2.



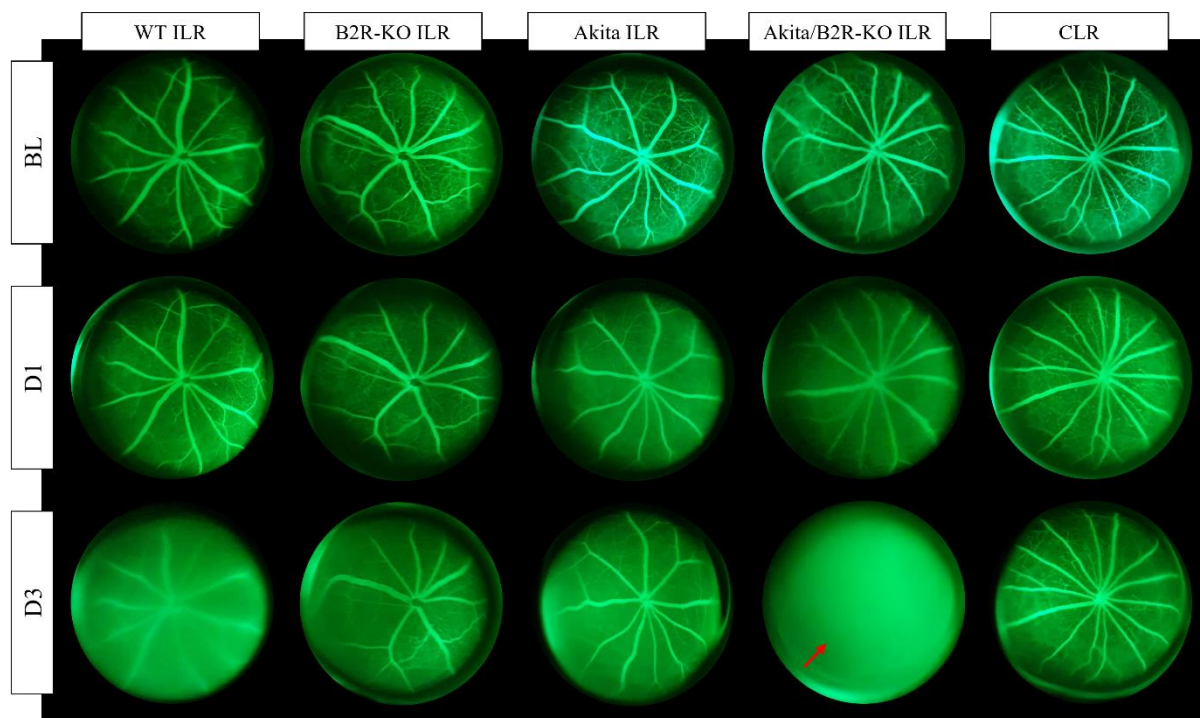
Slika 36. Šećerna bolest povećava, a nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 smanjuje učestalost opacifikacije rožnice i/ili leće ipsilateralnog (IL) oka nakon ishemije, koja se u dijabetičkim životinjama javlja i u kontralateralnom (CL) oku. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1) = 15, n (D3) = 6; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1) = 15, n (D3) = 9; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1) = 14, n (D3) = 7; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1) = 15, n (D3) = 7.



Slika 37. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 u šećernoj bolesti smanjuje, a u njenoj odsutnosti potiče razvoj ishemijske nekroze ipsilateralne mrežnice. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1) = 15, n (D3) = 6; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1) = 15, n (D3) = 9; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1) = 14, n (D3) = 7; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1) = 15, n (D3) = 7.

Također, u svrhu određivanja utjecaja šećerne bolesti i nedostatka B2R-a na status očne pozadine prije i nakon izazivanja ishemijske analizirani su fluoresceinski angiogrami očne pozadine ipsilateralnog i kontralateralnog oka prema kriteriju postojanja jasnih znakova kapilarnog curenja fluoresceina prije te 1. i 3. dana nakon MCAO zahvata. Na angiogramima

očne pozadine snimanima prije MCAO zahvata ni kod jedne životinje nije zabilježeno curenje fluoresceina (Slika 38). Na angiogramima snimanima u obje vremenske točke nakon MCAO zahvata također ni kod jedne od životinja nije zabilježena prisutnost curenja fluoresceina (Slika 38).

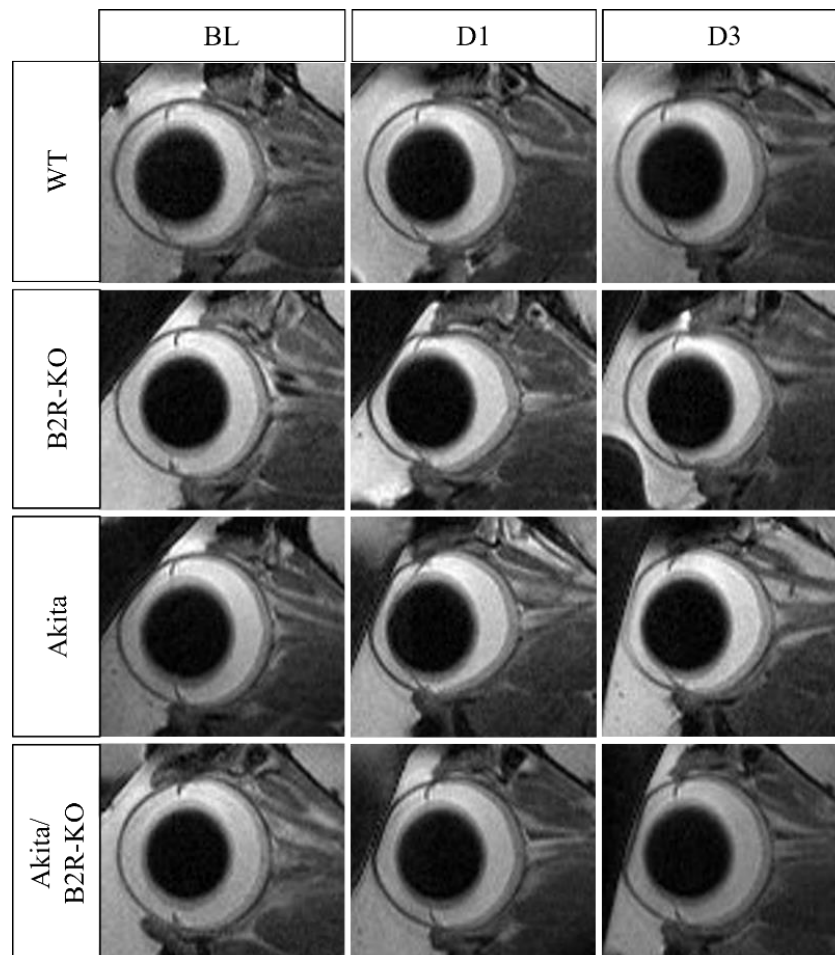


Slika 38. Reprezentativne slike fluoresceinskih angiograma očne pozadine prikazuju nalaze ipsilateralne mrežnice (ILR) prije i nakon MCAO zahvata kod dijabetičkih Akita i Akita/B2R-KO miševa te njihovih B2R-KO i WT nedijabetičnih kontrola. U dijelu prikazanih ipsilateralnih mrežnica vidljivi su primjeri u kojima jasna analiza angiograma nije moguća uslijed opacifikacije rožnice/leće (crvena strelica). Desni stupac prikazuje primjer angiograma kontralateralne mrežnice (CLR). Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa: WT, miševi divljeg tipa; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2; Akita, dijabetični miševi; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2.

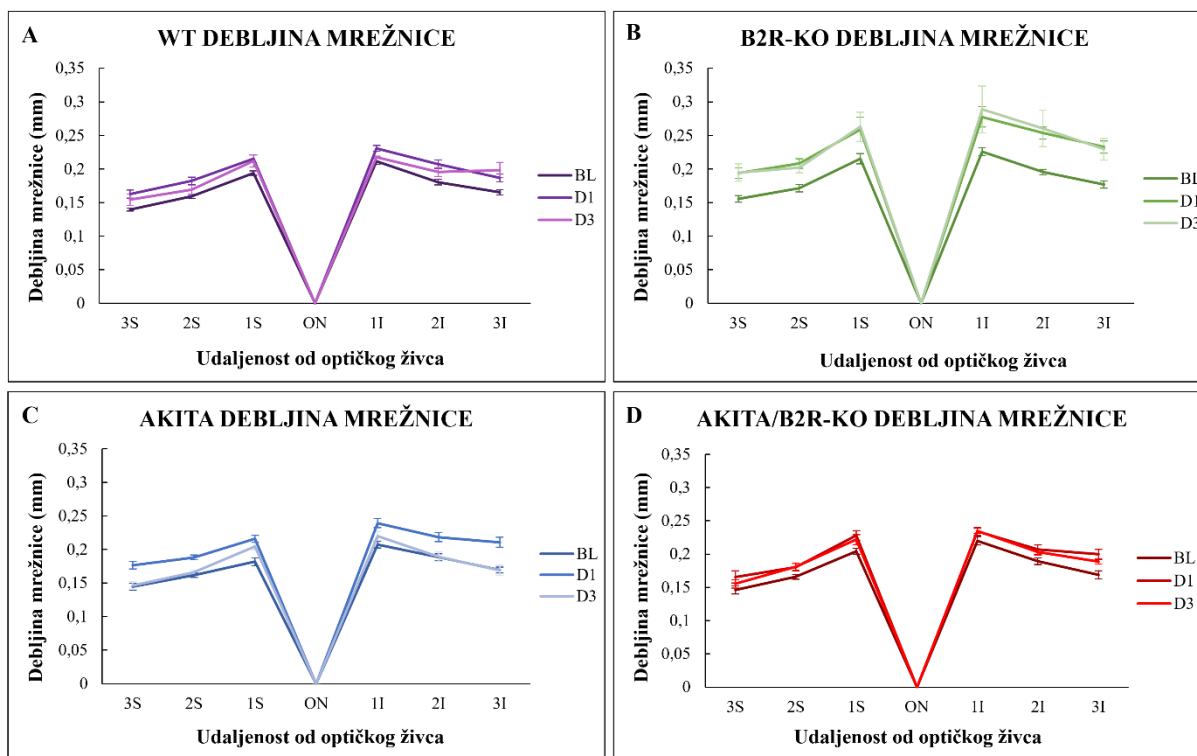
5.17. Zadebljanje mrežnice uslijed ishemije izraženije je u miševa s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2

U svrhu praćenja utjecaja šećerne bolesti i nedostatka B2R-a na razvoj ishemijske lezije mrežnice, analizirane su promjene u morfologiji mrežnice nakon MCAO zahvata praćene *in vivo* snimanjem ipsilateralnog oka magnetskom rezonancijom (Slika 39). Prije indukcije

ishemije nije bilo značajnih razlika u debljini mrežnica među skupinama (Slika 40). Prvi dan nakon MCAO zahvata u sve četiri skupine došlo je do zadebljanja mrežnice u svih 6 mjerenih točaka od ON-a, znatnije za B2R-KO skupinu. Na 3. dan od MCAO zahvata u Akita skupini je u području periferije mrežnice došlo do potpune rezolucije edema, dok je u centralnom području došlo do djelomične rezolucije edema (Slika 40A). U Akita/B2R-KO skupini je na 3. dan od zahvata došlo do neznatne promjene u debljini mrežnice u odnosu na 1. dan (Slika 40B). U WT skupini je u svim mjerenim područjima primijećena djelomična rezolucija edema (Slika 40C). U B2R-KO skupini nije došlo do rezolucije edema u odnosu na 1. dan od zahvata (Slika 40D).

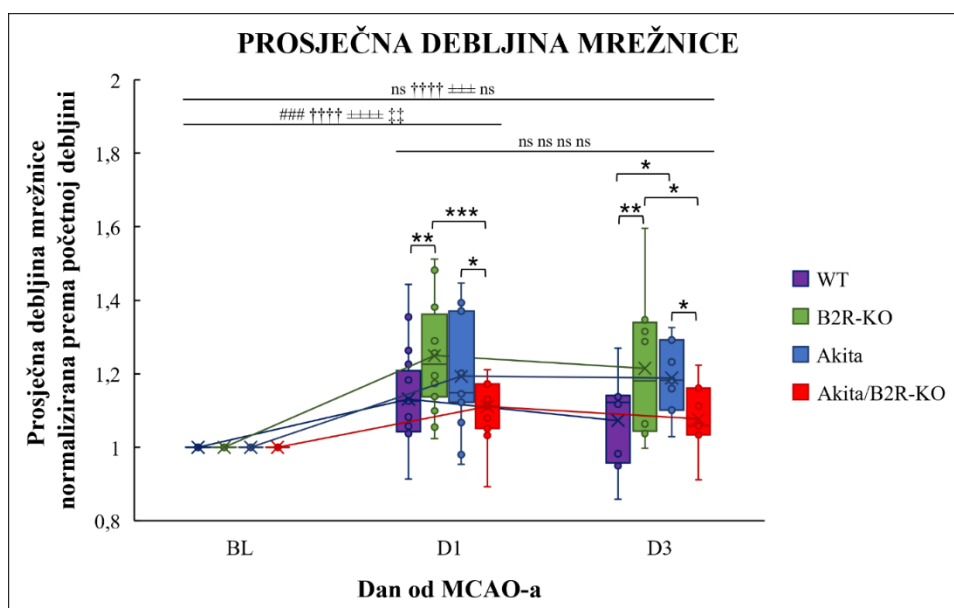


Slika 39. Reprezentativne T2 snimke oka prikazuju morfologiju zdravog ipsilateralnog oka prije MCAO zahvata i promjene u debljini mrežnice kao posljedicu ishemije kod dijabetičkih Akita i Akita/B2R-KO miševa te njihovih B2R-KO i WT nedijabetičkih kontrola nakon MCAO zahvata. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa: WT, miševi divljeg tipa; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2; Akita, dijabetični miševi; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2.



Slika 40. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 odgađa rezoluciju edema mrežnice nakon ishemije, neovisno o prisutnosti šećerne bolesti. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1) = 17, n (D3) = 8; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1) = 16, n (D3) = 8; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1) = 15, n (D3) = 7; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1) = 15, n (D3) = 7.

Rezultati usporedbe normalizirane prosječne debljine mrežnice također su pokazali značajno prosječno zadebljanje mrežnice na oba dana od MCAO zahvata u odnosu na početne vrijednosti (Slika 41). Između dijabetičnih Akita i nedijabetičnih WT miševa nije bilo značajne razlike u zadebljanju mrežnice 1. dan nakon MCAO zahvata, međutim 3. dan od zahvata je mrežnica Akita skupine bila značajno deblja u odnosu na WT skupinu (Akita naspram WT, $P < 0,05$). Dijabetični Akita/B2R-KO miševi su na 1. i na 3. danu pokazali značajno manje zadebljanje mrežnice u usporedbi s dijabetičnim Akita miševima (Akita/B2R-KO D1 naspram Akita D1, $P < 0,05$; Akita/B2R-KO D3 naspram Akita D3, $P < 0,05$) i u usporedbi s B2R-KO kontrolama (Akita/B2R-KO D1 naspram B2R-KO D1, $P < 0,0004$; Akita/B2R-KO D3 naspram B2R-KO D3, $P < 0,05$). Zadebljanje mrežnice nakon MCAO zahvata kod B2R-KO miševa bilo je značajno veće i u usporedbi s WT miševima (WT D1 naspram B2R-KO D1, $P < 0,05$; WT D3 naspram B2R-KO D3, $P < 0,01$).



Slika 41. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 u dijabetičnim životinjama značajno smanjuje, a u nedijabetičnim povećava prosječnu debljinu mrežnice nakon ishemije. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći mješoviti model ANOVA s Tukeyjevim *post hoc* testom: (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,005$; (***) $P < 0,001$. Statistički značajne razlike unutar WT genotipa: (####) $P < 0,001$; B2R-KO genotipa: (††††) $P < 0,0001$; Akita genotipa: (±±±) $P < 0,001$, (±±±±) $P < 0,0001$; Akita/B2R-KO genotipa: (‡‡) $P < 0,01$. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1) = 17, n (D3) = 8; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1) = 16, n (D3) = 8; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1) = 15, n (D3) = 7; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2, n (BL, D1) = 15, n (D3) = 7.

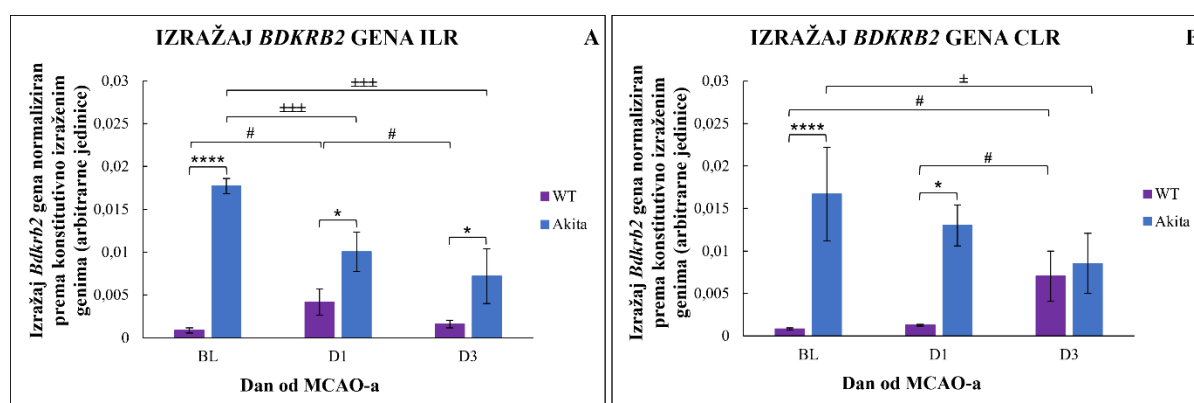
5.18. Šećerna bolest mijenja genski izražaj bradikininskih receptora u mrežnici prije i nakon ishemijske ozljede

U svrhu određivanja utjecaja šećerne bolesti na genski izražaj bradikininskih receptora u mrežnicama oba oka prije i nakon ishemijske ozljede, provedena je kvantitativna analiza izražaja mRNA bradikininskih receptora u ipsilateralnoj mrežnici i kontralateralnoj mrežnici prije i nakon ishemijske ozljede.

U zdravim očima WT miševa, prije MCAO zahvata, izražaj gena za B2R u mrežnici je vrlo nizak. Izražaj gena za B2R u ILR-u (Slika 42A) i CLR-u (Slika 42B) dijabetičnih Akita miševa bio je značajno viši u usporedbi s WT miševima (Akita ILR naspram WT ILR, $P < 0,0001$; Akita CLR naspram WT CLR, $P < 0,0001$). U mrežnicama Akita/B2R-KO i B2R-KO životinja, kao i u mozgu, nije došlo do transkripcije gena za B2R. Izražaj gena za B2R u

ILR-u je i nakon MCAO zahvata bio značajno viši kod dijabetičkih Akita nego njihovih WT kontrola (Akita D1 naspram WT D1, $P < 0,05$; Akita D3 naspram WT D3, $P < 0,05$). Na 1. dan od zahvata u Akita skupini došlo je do značajnog pada (Akita BL naspram D1, $P < 0,001$), a u WT skupini do blagog porasta u izražaju (WT BL naspram D1, $P < 0,05$; D1 naspram D3, $P < 0,05$).

Izražaj gena za B2R u CLR-u (Slika 42B) na 1. dan od MCAO zahvata nije se mijenjao ni u jednoj skupini (Akita D1 naspram WT D1, $P < 0,05$), međutim na 3. dan je uslijed značajnog pada izražaja u Akita skupini (Akita BL naspram D3, $P < 0,05$) i značajnog porasta izražaja u WT skupini (WT D1 naspram D3, $P < 0,05$) nestalo razlike u izražaju između ovih skupina.



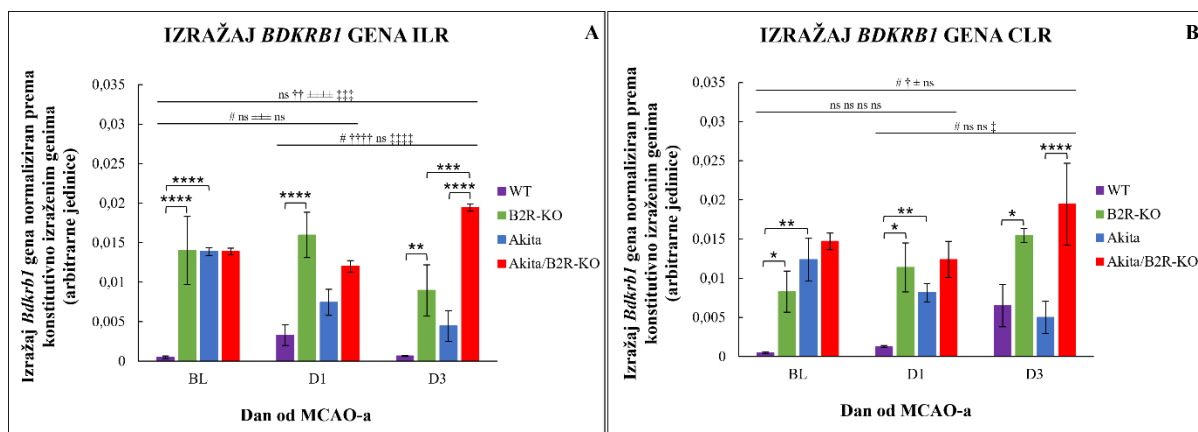
Slika 42. Šećerna bolest mijenja izražaj *Bdkrb2* gena prije i nakon MCAO zahvata u ipsilateralnoj (ILR) (A) i kontralateralnoj (CLR) (B) mrežnici. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći jednosmjerni ANOVA test uz korekciju za višestruke usporedbe kontrolirajući stopu lažnog otkrivanja ($\alpha = 0,05$): (*) $P < 0,05$; (****) $P < 0,0001$. Statistički značajne razlike unutar WT genotipa: (#) $P < 0,05$; Akita genotipa: (\pm) $P < 0,05$, ($+++$) $P < 0,001$. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1, D3) = 3; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1, D3) = 3.

Prije MCAO zahvata, izražaj gena za B1R u ILR-u (Slika 43A) i CLR-u (Slika 43B) bio je značajno viši i kod dijabetičkih Akita miševa i kod B2R-KO miševa u usporedbi s WT miševima (Akita ILR naspram WT ILR, $P < 0,0001$; Akita CLR naspram WT CLR, $P < 0,01$; B2R-KO ILR naspram WT ILR, $P < 0,0001$; B2R-KO CLR naspram WT CLR, $P < 0,05$).

Nakon MCAO zahvata, u ILR-u došlo je do značajnog pada izražaja u Akita skupini i blagog porasta u WT skupini (Akita BL naspram D1, $P < 0,0001$) te više nije bilo razlike u

izražaju gena za B1R. Kod dijabetičnih i kontrolnih miševa bez funkcionalnog B2R-a, na 1. dan od MCAO zahvata, kao i u početnoj točki, nije bilo značajne razlike u izražaju. Međutim, na 3. dan od zahvata izražaj gena za B1R dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa bio je značajno viši ne samo u usporedbi s B2R-KO kontrolama, već i s dijabetičnim Akita miševima (Akita/B2R-KO BL naspram D3, $P < 0,001$; Akita/B2R-KO D3 naspram B2R-KO D3, $P < 0,001$; Akita/B2R-KO D3 naspram Akita D3, $P < 0,0001$). Kod B2R-KO miševa, izražaj gena za B1R bio je značajno viši u usporedbi s WT miševima na 1. i na 3. dan od MCAO zahvata (B2R-KO D1 naspram WT D1, $P < 0,0001$; B2R-KO D3 naspram WT D3, $P < 0,01$).

Prvi dan od MCAO zahvata, u CLR-u je izražaj gena za B1R kod dijabetičnih Akita miševa bio i dalje značajno viši u usporedbi s WT miševima (Akita D1 naspram WT D1, $P = 0,002$), no na 3. dan je padom izražaja u Akita skupini (Akita BL naspram D3, $P = 0,0209$) i porastom izražaja u WT skupini nestalo razlike u izražaju (WT D1 naspram WT D3, $P = 0,002$). Između dijabetičnih Akita/B2R-KO i kontrolnih B2R-KO miševa, nakon MCAO zahvata u CLR-u nije bilo razlike u izražaju gena za B1R. Između dijabetične Akita i Akita/B2R-KO skupine na 1. dan od MCAO zahvata nije bilo razlike, ali je na 3. dan kao i u ILR-u izražaj gena za B1R bio značajno viši u Akita/B2R-KO skupini (Akita/B2R-KO D3 naspram Akita D3, $P < 0,0001$). Kod B2R-KO miševa izražaj gena za B1R ostao je značajno viši u usporedbi s WT miševima na 1. i 3. dan od MCAO zahvata (B2R-KO D1 naspram WT D1, $P < 0,05$; B2R-KO D3 naspram WT D3, $P < 0,05$).



Slika 43. Šećerna bolest i nedostatak bradikininog receptora tipa 2 mijenjaju izražaj *Bdkrb1* gena prije i nakon MCAO zahvata u ipsilateralnoj (ILR) (A) i kontralateralnoj (CLR) (B) mrežnici. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajne razlike među genotipovima, koristeći jednosmjerni ANOVA test uz korekciju za višestruke usporedbe kontrolirajući stopu lažnog otkrivanja ($\alpha=0,05$): (*) $P<0,05$; (**) $P<0,01$; (***) $P<0,001$; (****) $P<0,0001$. Statistički značajne razlike unutar WT genotipa: (#) $P<0,05$; B2R-KO genotipa: (†) $P<0,05$, (††) $P<0,01$, (††††) $P<0,0001$; Akita genotipa: (\pm) $P<0,05$, ($\pm\pm\pm$) $P<0,001$, ($\pm\pm\pm\pm$) $P<0,0001$; Akita/B2R-KO genotipa: (\ddagger) $P<0,05$, ($\ddagger\ddagger$) $P<0,01$, ($\ddagger\ddagger\ddagger$) $P<0,001$, ($\ddagger\ddagger\ddagger\ddagger$) $P<0,0001$. Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa i broj životinja: WT, miševi divljeg tipa, n (BL, D1, D3) = 3; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3; Akita, dijabetični miševi, n (BL, D1, D3) = 3; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininog receptora tipa 2, n (BL, D1, D3) = 3.

5.19. Stanice mikroglije mrežnice izražavaju oba tipa bradikinskih receptora

S ciljem određivanja izražaja oba tipa bradikininских receptora na stanicama mikroglije prije i nakon MCAO zahvata, provedena je metoda dvostrukog imunofluorescentnog obilježavanja tkiva mrežnice korištenjem protutijela koja se specifično vežu na B1R ili B2R u kombinaciji s protutijelima za mikrogliju (Iba1). Mjerenje je provedeno u vremenskim točkama prije te 1. i 3. dan nakon MCAO zahvata. Analiza rezultata pokazuje kako je B1R izražen u stanicama mikroglije kod sve četiri eksperimentalne skupine u sve tri vremenske točke (Slika 44), dok je u sve tri vremenske točke B2R izražen samo u Akita i WT skupinama (Slika 45).

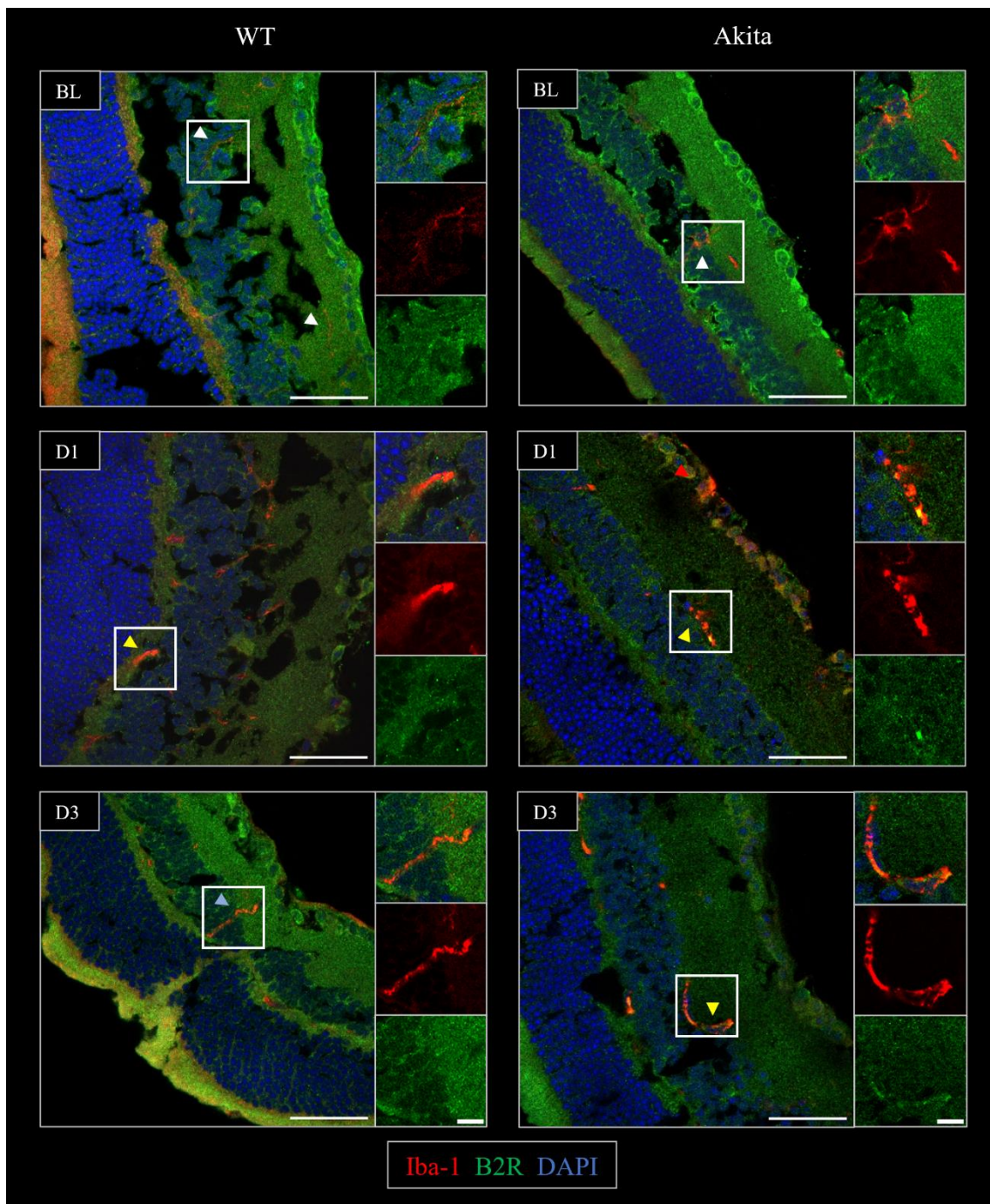
U WT skupini, prije izazivanja ishemije, stanice mikroglije su pokazivale odlike rezidentnih stanica, male some, s više višestruko razgranatih tankih staničnih nastavaka, pretežno locirane u unutrašnjem i vanjskom mrežastom sloju mrežnice (Slika 44 i 45, WT BL). Prvi dan nakon MCAO zahvata stanice mikroglije su pokazivale izrazitu promjenu fenotipa, poprimajući odlike aktiviranih, s oboljenjem povezanih stanica mikroglije (engl. *disease-*

associated microglia), pri čemu je najveći broj stanica imao izgled „prijelaznog“ štapićastog morfotipa, tj. mikroglije karakterizirane duguljastim tijelom s ponešto debelih nastavaka. Uz smještaj u vanjskom i unutrašnjem mrežastom sloju mrežnice, velik broj stanica se nalazio u unutrašnjem zrnatom sloju i sloju ganglijskih stanica (Slika 44 i 45, WT D1). Na 3. dan od MCAO zahvata stanice poprimaju pretežito dva oblika, hiperrazgranati (s obilnijim nastavcima koji su duži i deblji, pričvršćeni na veću, lobularnu i nepravilno oblikovanu somu) ili ameboidni (s okruglijom, većom i pravilnije oblikovanom somom te vrlo malo kratkih nastavaka), koje su bile rasprostranjene kroz sve slojeve, ali obilnije u sloju ganglijskih stanica (Slika 44 i 45, WT D3).

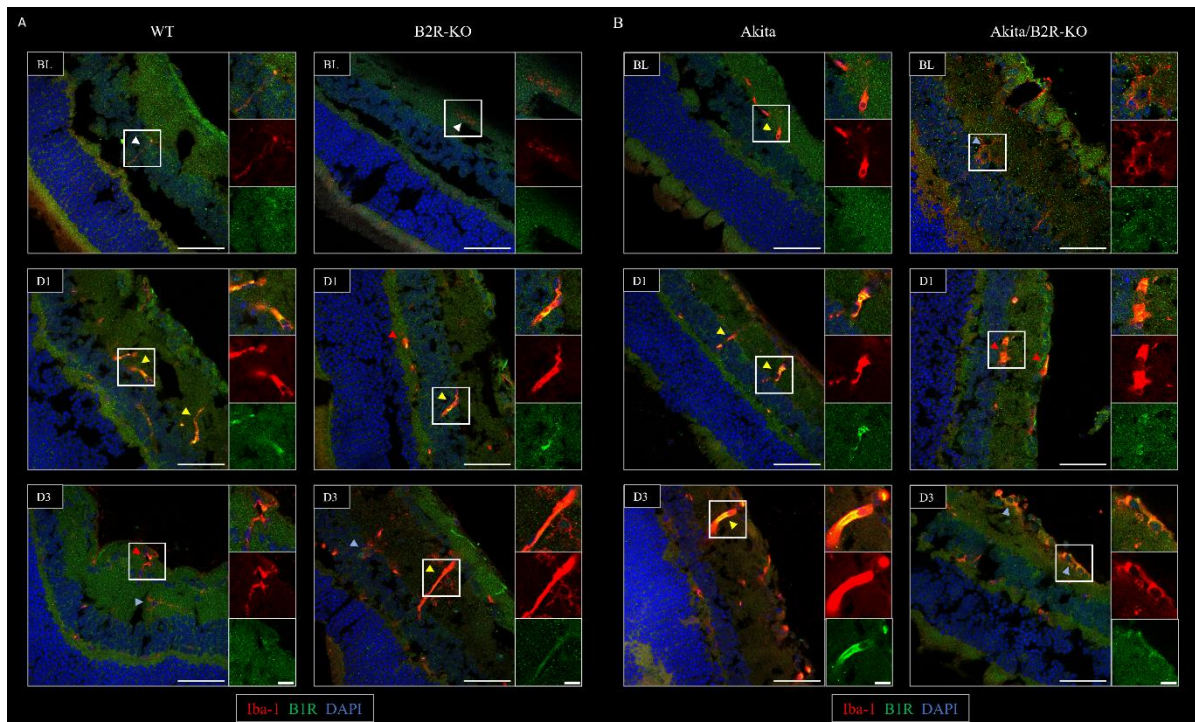
U Akita skupini, prije izazivanja ishemije, osim rezidentnih stanica bilo je i ponešto stanica štapićastog fenotipa, s normalnom raspodjelom unutar tkiva mrežnice u unutrašnjem i vanjskom mrežastom sloju (Slika 44 i 45, Akita BL). Prvi dan nakon MCAO zahvata većina stanica Akita skupine bila je ili štapićastog ili ameboidnog morfotipa, rasprostranjena kroz unutrašnje slojeve mrežnice, nešto obilnije u sloju ganglijskih stanica (Slika 44 i 45, Akita D1). Na 3. dan od MCAO zahvata stanice mikroglije su kao i u 1. danu bile štapićastog ili ameboidnog morfotipa, ali deblje some nego 1. dana, obilno rasprostranjene u sloju ganglijskih stanica (Slika 44 i 45, Akita D3).

U Akita/B2R-KO skupini, prije MCAO zahvata, uz rezidentne stanice moglo se naći hiperrazgranatih stanica, s normalnom raspodjelom unutar tkiva mrežnice (Slika 44 Akita/B2R-KO, BL). Prvi dan nakon MCAO zahvata većina stanica mikroglije Akita/B2R-KO skupine bila je ameboidnog morfotipa, rasprostranjena kroz unutrašnje slojeve mrežnice (Slika 44 Akita/B2R-KO, D1). Na 3. dan od MCAO zahvata stanice mikroglije su većinom bile hiperrazgranatog morfotipa, nešto obilnije rasprostranjene u sloju ganglijskih stanica (Slika 44 Akita/B2R-KO, D3).

U B2R-KO skupini, kao i kod WT skupine, prije MCAO zahvata nalazimo samo rezidentne razgranate stanice mikroglije male okrugle some, rasprostranjene u unutrašnjem i vanjskom mrežastom sloju (Slika 44 B2R-KO BL). Prvi dan nakon MCAO zahvata većina stanica B2R-KO skupine bila je ili zgusnutog štapićastog ili ameboidnog morfotipa, rasprostranjena kroz unutrašnje slojeve mrežnice uz nešto obilniju raspodjelu u vanjskom mrežastom sloju (Slika 44 B2R-KO D1). Na 3. dan od MCAO zahvata stanice mikroglije B2R-KO skupine većinom su bile hiperrazgranatog ili štapićastog morfotipa uz dosta stanica ameboidnog morfotipa, pretežito rasprostranjenih u mrežastim slojevima uz poneku stanicu u unutrašnjem zrnatom sloju (Slika 44 B2R-KO D3).



Slika 44. Reprezentativne slike izražaja bradikinskog receptora tipa 2 (B2R) na stanicama mikroglije dijabetičnih Akita miševa i nedijabetičnih WT kontrola. Rezovi mišjeg oka dvostruko imunofluorescentno obilježeni B2R protutijelom (zeleno) u kombinaciji s Iba1 protutijelom (crveno) prije i nakon MCAO zahvata. Umetak prikazuje povećanu stanicu mikroglije i kolokalizaciju crvenog Iba1 signala specifičnog za mikrogliju sa zelenim signalom za B2R, dokazujući prisutnost B2R na stanicama mikroglije u svim vremenskim točkama. DAPI-pozitivne jezgre (plavo). Na slikama su strelicama označene stanice mikroglije razgranatog (bijela strelica), štapičastog (žuta strelica) i hiperragranatog (plava strelica) izgleda. Mjerna oznaka: slika 50 μm , umetak 10 μm . Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa: WT, miševi divljeg tipa; Akita, dijabetični miševi.



Slika 45. Reprezentativne slike izražaja bradikininskog receptora tipa 1 (B1R) na stanicama mikroglije u nedijabetičnih WT i B2R-KO miševa (A) i dijabetičnih Akita i Akita/B2R-KO miševa (B). Rezovi mišjeg oka dvostruko imunofluorescentno obilježeni B1R protutijelom (zeleno) u kombinaciji s Iba1 protutijelom (crveno) prije i nakon MCAO zahvata. Umetak prikazuje povećanu stanicu mikroglije i kolokalizaciju crvenog Iba1 signala specifičnog za mikrogliju sa zelenim signalom za B1R, dokazujući prisutnost B1R na stanicama mikroglije u svim vremenskim točkama. DAPI-pozitivne jezgre (plavo). Na slikama su strelicama označene stanice mikroglije razgranatog (bijela strelica), štapičastog (žuta strelica), ameboidnog (crvena strelica) i hiperragranatog (plava strelica) izgleda. Mjerna oznaka: slika 50 μm , umetak 10 μm . Vremenske točke: BL, početno stanje; D1, 1. dan nakon MCAO zahvata; D3, 3. dan nakon MCAO zahvata. Oznake genotipa: WT, miševi divljeg tipa; B2R-KO, miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2; Akita, dijabetični miševi; Akita/B2R-KO, dijabetični miševi s nedostatkom bradikininskog receptora tipa 2.

6. RASPRAVA

6.1. Bradikininski receptor tipa 2 sudjeluje u metabolizmu glukoze i regulaciji intraokularnog tlaka u miševa sa šećernom bolesti

Sistemska upala i hiperglikemija u šećernoj bolesti imaju negativan utjecaj na ishemijsku kaskadu, povećavajući staničnu smrt, rizik od trajnih funkcionalnih i kognitivnih deficita te smrtnost nakon ishemijskog moždanog udara (21,22). Bradikininski signalni put jedan je od mnogih upalnih puteva čija je aktivacija promijenjena u šećernoj bolesti (140). Bradikinin je endogeni peptid, član kalikrein-kininskog sustava, koji spada među prve upalne čimbenike koji se oslobađaju s nastupom ishemije (125). U tkivu mozga i mrežnice djeluje vezujući se na konstitutivno izražen B2R i, u obliku metabolita des-Arg⁹-bradikinina, vezanjem na B1R, a čiji je izražaj induciran upalom (138). Dosadašnja istraživanja govore u prilog dvojakom učinku aktivacije bradikininskog signalnog puta u ishemiji, koji s jedne strane sudjeluje u sekundarnom ishemijskom oštećenju potičući stvaranje edema i dodatnog oštećenja, a s druge strane pokazuje neuroprotektivno djelovanje prevencijom stanične smrti. Međutim, kako je većina istraživanja dala oprečne rezultate, njegova sveukupna uloga u ishemijskom moždanom udaru još uvijek nije u potpunosti razjašnjena (167,180). Također, kako se u šećernoj bolesti mijenja izražaj bradikininskih receptora, nameće se pitanje uloge bradikininskog signalnog puta u upalnom odgovoru u šećernoj bolesti (140).

Stoga je glavni cilj ovog istraživanja bio odrediti kako šećerna bolest utječe na ulogu signalnog puta bradikinina u razvoju edema te odgovoru mikroglije u mišjem modelu ishemijske ozljede mozga i mrežnice. U tu svrhu korišteni su Akita miševi s dijabetesom tipa 1 i dijabetični Akita/B2R-KO miševi s onemogućenim genom za B2R te njihove nedijabetične kontrole. Kako se često koriste kao eksperimentalni model dijabetesa tipa 1, mnoge fiziološke karakteristike miševa heterozigotnih za Akita mutaciju *Ins2* gena već su opisane u literaturi (209,217–220). Međutim, B2R-KO životinje nisu u potpunosti fiziološki okarakterizirane, a još manje je podataka o utjecaju nedostatka B2R-a na životinje sa šećernom bolesti. U eksperimentalnim istraživanjima ishemijskog moždanog udara često se koriste transgenične životinje kako bi se odredio utjecaj određenog gena na ishod bolesti, međutim često se zanemaruju moguće fiziološke promjene u tim životinjama koje mogu značajno utjecati na razvoj ishemijske lezije, kao i na interpretaciju samih rezultata. Kako bi prije indukcije ishemije izuzeli utjecaj nedostatka B2R-a na moguće promjene u glikemijskom statusu te krvnom i

očnom tlaku, prije ulaska u pokus kod svih životinja određen je glikemijski status, tjelesna masa te krvni i intraokularni tlak.

Kod dijabetičnih Akita i Akita/B2R-KO miševa je u skladu s prethodnim istraživanjima potvrđena hiperglikemija (Slika 7) u usporedbi s nedijabetičkim kontrolama jednake starosti (209,217,218). Također u skladu s prethodnim istraživanjima, ovim je istraživanjem pokazano da nedostatak B2R-a ne utječe na bazalnu koncentraciju i koncentraciju glukoze natašte u krvi zdravih miševa (209,217). Iako su rezultati upućivali na isti zaključak kod dijabetičnih miševa, potrebno je istaknuti kako je maksimalna izmjerena razina glukoze bila limitirana korištenim mjernim uređajem te zbog tog ograničenja. *In vitro* istraživanja su pokazala da B2R pomaže unos glukoze u mišićne i masne stanice, no unatoč ovim rezultatima još uvijek nije poznata točna uloga B2R-a u metabolizmu glukoze, kao ni ima li ulogu u unosu glukoze u stanice središnjeg živčanog sustava (126,217). Nadalje, u ovom istraživanju, provedenome na 3 do 4 mjeseca starim miševima, uz prethodno navedene rezultate ni intraperitonealni test tolerancije na glukozu nije pokazao razliku u metabolizmu glukoze nedijabetičnih B2R-KO i WT miševa (Slika 8), dok na dijabetičnim skupinama nije rađen zbog opasnosti od razvoja hiperglikemijske kome. S obzirom na to da akutni stres može imati značajan učinak na koncentraciju glukoze u krvi, provedena su i dodatna mjerenja udjela glikoziliranog hemoglobina u krvi, koja su sukladno prethodnim istraživanjima pokazala značajno veći udio glikiranog hemoglobina kod dijabetičnih Akita u usporedbi s miševima divljeg tipa (219), dok za miševe s nedostatkom B2R-a ni ovim testom nije pronađena razlika u odnosu na divlji tip (Slika 9). S druge strane, udio glikiranog hemoglobina kod dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa, osim što je očekivano bio značajno viši u odnosu na kontrolnu nedijabetičnu skupinu, bio je viši i u odnosu na dijabetične Akita miševe. Prethodno navedenim je pokazano da nedostatak B2R-a ne utječe na razinu glukoze u krvi zdravih mladih životinja, ali kod dijabetičnih životinja s poremećenim metabolizmom glukoze ipak dovodi do pogoršanja glikemijskog statusa, što govori u prilog ulozi B2R-a u transportu glukoze u stanice. Povišena razina glikiranog hemoglobina upućuje na sistemsku upalu u dijabetičnih miševa za koju je vjerojatno da je zbog goreg glikemijskog statusa izraženija u dijabetičkih Akita/B2R-KO miševa (221).

U usporedbi s nedijabetičkim kontrolama jednake starosti, kod dijabetičnih Akita i Akita/B2R-KO miševa je u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja uočena i značajno manja tjelesna masa (Slika 10) (209,217,218). Gubitak tjelesne mase učestao je simptom nekontroliranog dijabetesa tipa 1, prilikom kojega zbog nedostatka inzulina i smanjenog unosa glukoze u stanice organizam pojačano razgrađuje masti i proteine kako bi zadovoljilo

energetske potrebe (222). Nadalje, u suprotnosti s istraživanjima koja ne pokazuju razlike u tjelesnoj masi nedijabetičnih B2R-KO životinja, ovim istraživanjem pokazano je da B2R-KO miševi imaju značajno veću tjelesnu masu od miševa divljeg tipa (209,217). Pretpostavka je da ova nepodudarnost proizlazi iz različite starosti korištenih životinja, jer je prethodnim istraživanjem pokazano da B2R-KO miševi imaju značajno smanjen izražaj miostatina, koji regulira rast skeletnih mišića, a što dovodi do povećane mišićne mase u odnosu na miševe divljeg tipa te posljedično i do povećane tjelesne mase B2R-KO miševa, ali koja je zamjetna samo u prva 4 mjeseca starosti (223).

Hipertenzija se, zbog vaskularnih promjena izazvanih hiperglikemijom, često javlja u šećernoj bolesti, međutim ranija istraživanja pokazuju da kod dijabetičnih Akita miševa nema značajne razlike u krvnom tlaku u odnosu na miševe divljeg tipa (220,224). Bradikininski receptor tipa 2 svojim vazogenim djelovanjem sudjeluje u regulaciji krvnog tlaka, međutim prethodno opisana istraživanja su pokazala da B2R-KO životinje na standardnoj prehrani nemaju značajne promjene u krvnom tlaku u odnosu na divlji tip, ali brže razvijaju hipertenziju na prehrani s visokim udjelom soli (209,217,225). S obzirom na to da povišeni krvni tlak može štetno utjecati na razvoj ishemijske lezije, isti je izmjeren u svim skupinama (Slika 11) te je pokazano da nema razlike među skupinama u sistoličkom, dijastoličkom ili srednjem arterijskom tlaku (226). U skladu s opažanjima prethodnih istraživanja, ovim istraživanjem je potvrđeno da šećerna bolest i nedostatak B2R-a, zasebno i u kombinaciji, ne utječu na krvni tlak mladih životinja. Kako je prethodno u miševima različitih sojeva pokazano da intraokularni tlak nije u direktnoj korelaciji s krvnim tlakom, izvedeno je i neinvazivno mjerenje intraokularnog tlaka, koje je pokazalo razvoj očne hipertenzije kod dijabetičnih Akita miševa (Slika 12) (227). Visoki intraokularni tlak se često javlja u odmaklim stadijima šećerne bolesti te kod nekontrolirane hiperglikemije (228). U prethodno opisanom istraživanju pokazano je da dugotrajna inhibicija transkripcijskog čimbenika NF- κ B u potpunosti sprječava razvoj očne hipertenzije kod dijabetičnih Akita miševa, jer se time smanjuje izražaj proupalnih čimbenika te čuva integritet čvrstih spojeva krvno-mrežnične barijere (229). Na povećanu propusnost krvno-mrežnične barijere u šećernoj bolesti utječe i B2R izražen na endotelnim stanicama koji se aktivira pod utjecajem hiperglikemije i upalnih čimbenika (176). Kod zečeva je pokazano da intraokularna primjena egzogenog bradikinina aktivacijom B2R-a dovodi do pojačane proizvodnje očne vodice i porasta intraokularnog tlaka povećanjem propusnosti krvno-mrežnične barijere (230). U ovom istraživanju je po prvi puta pokazano da nedostatak B2R-a, slično kao i dugotrajna inhibicija transkripcijskog čimbenika NF- κ B u prethodnom

istraživanju, nema utjecaja na intraokularni tlak zdravih životinja, ali zato sprječava njegov rast kod dijabetičnih životinja. Ovaj rezultat je ujedno i potvrda prethodnih istraživanja, s obzirom na to da je transkripcijski čimbenik NF- κ B sastavni dio signalne kaskade B2R-a (231). Stoga je niži intraokularni tlak dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa u odnosu na Akita skupinu vjerojatno posljedica bolje očuvanog integriteta krvno-mrežnične barijere i smanjene vaskularne propusnosti uslijed nedostatka funkcionalnog B2R-a. Na temelju navedenoga pokazano je da i šećerna bolest i B2R mogu utjecati na intraokularni tlak te da nedostatak B2R-a sprječava razvoj očne hipertenzije kod dijabetičnih životinja.

6.2. Šećerna bolest i nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 utječu na moždanu postishemijsku vaskularnu propusnost

Prethodna istraživanja su pokazala da je vrhunac razvoja moždanog edema kod miševa otprilike trećeg dana od indukcije ishemije, kada je prema drugim istraživanjima istovremeno detektiran i porast u broju stanica mikroglije u oštećenom području. Zbog toga se ovo istraživanje usmjerilo na hiperakutnu (prvi dan) i akutnu (treći dan) fazu ishemije u svrhu provjere hipoteze da je proupalna uloga bradikinina u ishemiji mozga i mrežnice izraženija u šećernoj bolesti i da se očituje većim edemom te pojačanom aktivacijom i migracijom mikroglije (84,232).

Za istovremeno induciranje ishemije mozga i mrežnice odabran je modificirani Koizumi model 30-minutne okluzije srednje moždane arterije, jer je istraživanjem naše grupe u ovom modelu pokazan podjednak odgovor mozga i mrežnice na ishemiju (232). S obzirom na relativno kratko trajanje ishemije u odnosu na druge modele, kao i na kratko praćenje životinja, statistički nije bilo značajnih razlika u preživljenju među skupinama, iako je B2R-KO skupina pokazala 100%-tno preživljenje u odnosu na 77,7 – 87,5% u ostalim skupinama.

Analiza laserskog Dopplerovog signala pokazala je da uvođenjem silikonom obloženog konca kroz zajedničku karotidnu arteriju do mjesta grananja središnje moždane arterije dolazi do 80%-tne redukcije protoka kroz srednju moždanu arteriju u svim skupinama, ali i da nakon vađenja konca ne dolazi do potpune reperfuzije (Slika 13). Istraživanjem naše grupe pokazano je da u Koizumi modelu MCAO zahvata trajno podvezana zajednička karotidna arterija nakon izvlačenja silikoniziranog konca rezultira dugotrajnom hipoperfuzijom, ne samo srednje moždane arterije i njenih ogranaka, već i čitave arterijske vaskulature zahvaćene moždane

polutke. Tridesetminutna ishemija s kroničnom hipoperfuzijom pokazala se nužnom kako bi se istovremeno izazvalo trajno oštećenje mozga i mrežnice, što nije slučaj u alternativnom tridesetminutnom Longa modelu, koji izaziva oštećenje mozga, ali ne i mrežnice (232). Sukladno s prethodnim, ovim istraživanjem je pokazano da je u ovoj vrsti zahvata kod svih eksperimentalnih skupina perfuzija zahvaćene moždane polutke u hiperakutnoj i akutnoj fazi ishemije smanjena u odnosu na početno stanje i u odnosu na kontralateralnu moždanu polutku (Slika 14). Šećerna bolest i nedostatak B2R-a nisu utjecali na perfuziju moždanih polutki tijekom ni nakon MCAO zahvata.

Kako bi se sukladno 3R načelu što više smanjio broj životinja uključenih u istraživanje, razvoj ishemijske lezije praćen je *in vivo* neinvazivnim snimanjem mozga magnetskom rezonancijom, što omogućuje snimanje istih životinja kroz više vremenskih točaka. Segmentacijom hiperintenzivnog područja na T2 mapi dobivene vrijednosti volumena ishemijske lezije pokazale su da nema razlike među skupinama (Slika 16). Prije ovog istraživanja, samo jedno istraživanje bavilo se razvojem ishemijske lezije u mozgu dijabetičnih Akita miševa. U tom istraživanju, kao i u većini ostalih koji koriste druge životinjske modele šećerne bolesti, ishemija je uzrokovala značajno veće lezije prvi dan od MCAO zahvata kod dijabetičnih životinja u odnosu na nedijabetične kontrole (113,233–235). Postoji nekoliko mogućih razloga za dobivenu razliku. Prvi je sama metoda indukcije ishemije. U navedenom istraživanju za izazivanje ishemije kod dijabetičnih Akita i njihovih kontrola korišten je Longa model MCAO zahvata u kojem se silikonizirani konac uvodi kroz vanjsku karotidnu arteriju bez trajnog podvezivanja zajedničke karotidne arterije, zbog čega, za razliku od Koizumi modela, dolazi do potpune reperfuzije unutar tjedan dana od zahvata (232). Naša grupa je pokazala da u jednakom trajanju ishemije Longa model izaziva značajno veće ishemijsko oštećenje mozga u akutnoj fazi nego Koizumi model (232). Osim toga, trajanje ishemije u ranije navedenom istraživanju iznosilo je 40 minuta, što je 10 minuta duže nego u ovom istraživanju, a poznato je da kod miševa s produljenjem okluzije raste veličina ishemijskog oštećenja (236). Stoga je moguće da je razlika u veličini ishemijske lezije između dijabetičnih i nedijabetičnih životinja izraženija u modelima s potpunom reperfuzijom ili u modelima koji izazivaju jače ishemijsko oštećenje. Drugi mogući razlog je metoda određivanja volumena ishemijske lezije. U ovom istraživanju korištena je pretklinička magnetska rezonancija, koja omogućava *in vivo* praćenje razvoja lezije u istoj životinji u više vremenskih točaka mjerenjem područja promijenjenog T2 vremena relaksacije, za razliku od ustaljenih metoda bojenja trifetil-tetrazolij kloridom (engl. *triphenyl tetrazolium chloride*), koje slabijim obojenjem

određuje područje smanjene mitohondrijske aktivnosti, ili bojenja po Nisslu, koje slabije boja stanične elemente koji su metabolički narušeni. Ove metode koriste izolirano tkivo koje prolazi histološku obradu, a koja uzrokuje različito skupljanje zdravog i ishemijskog zahvaćenog tkiva, ali i distorziju tkiva prilikom rezanja i obrade (237). Nedostatak B2R-a nije značajno utjecao na veličinu lezije dijabetičnih i nedijabetičnih miševa u hiperakutnoj ni u akutnoj fazi ishemijske, što je u skladu s prethodnim istraživanjem u kojem su prvi dan nakon izazivanja 60-minutne ishemijske B2R-KO miševi i miševi divljeg tipa imali podjednaku veličinu lezije (164). S druge strane, postoje i istraživanja koja pokazuju da nedostatak B2R-a smanjuje veličinu lezije te istraživanja u kojima je nedostatak B2R-a doveo do značajnog povećanje ishemijske lezije u odnosu na miševne divljeg tipa (125,169). Osim već spomenutih razlika u eksperimentalnom modelu, koje su i u ovom slučaju mogle dovesti do različitih opažanja, treba spomenuti da je u navedenim radovima, kako bi se izbjegao utjecaj edema, veličina lezije izražena kao postotak kontralateralne moždane polutke ili dobivena oduzimanjem nezahvaćenog dijela zahvaćene ipsilateralne od ukupnog volumena nezahvaćene kontralateralne moždane polutke. Oba načina mogu potencijalno dovesti do krivih zaključaka jer, kao što je pokazano u ovom i prethodnim istraživanjima, ishemijsko oštećenje zahvaćene moždane polutke dovodi i do značajnih promjena u volumenu kontralateralne moždane polutke, naročito u akutnoj fazi (232). Osim toga, u istraživanju u kojem je nedostatak B2R-a izazvao značajno veće lezije u prva tri dana od MCAO zahvata, za razliku od ovog istraživanja u kojemu su korišteni samo mužjaci, korišteni su miševi oba spola, a da pri tome nije istražen utjecaj estrogena na B2R signalni put niti je određena faza spolnog ciklusa prilikom izazivanja ishemijske, iz čega mogu proizlaziti razlike (169). Stoga se može zaključiti da u odabranome modelu eksperimentalnog ishemijskog moždanog udara šećerna bolest i nedostatak B2R-a ne utječu značajno na volumen ishemijske lezije.

Kako je prethodno navedeno, snimke mozga dobivene magnetskom rezonancijom su pokazale da je razvoj ishemijske lezije i vazogenog edema doveo do ekspanzije ipsilateralne moždane polutke te istovremenog smanjenja kontralateralne polutke zbog ograničenog prostora u lubanji. Iako nije bilo značajne razlike u volumenu ishemijske lezije, promjene u volumenu moždanih polutki prvi dan od MCAO zahvata bile su značajno veće u dijabetičnim skupinama u odnosu na nedijabetične kontrole (Slika 17). Kod dijabetičnih Akita/B2R-KO životinja razlika u odnosu na kontrolnu B2R-KO skupinu bila je vidljiva i na treći dan od MCAO zahvata. Na treći dan od MCAO zahvata uočeno značajno smanjenje volumena kontralateralne polutke u usporedbi s prvim danom, što ukazuje na veću propusnost krvno-

moždane barijere. Time je pokazano da šećerna bolest dodatno potiče, a nedostatak B2R-a djelomično ublažuje promjene u volumenu moždanih polutki nakon ishemije. Nadalje, s obzirom na uočene razlike u promjeni volumena moždanih polutki nakon MCAO zahvata među skupinama, utjecaj šećerne bolesti i nedostatka B2R-a na razvoj moždanog edema dodatno je istražen kvantificiranjem otoka ipsilateralne polutke te određivanjem relativne količine vode u području lezije izračunom prosječnog intenziteta signala na T2 mapi. Većina kliničkih i eksperimentalnih istraživanja pokazuje da šećerna bolest potiče pojačano stvaranje edema nakon ishemije (117,233,238). Kod dijabetičnih Akita miševa je u akutnoj fazi nakon ishemije intravenoznom primjenom fluoresceina konjugiranog s albuminom pokazana povećana propusnost krvno-moždane barijere u odnosu na nedijabetične kontrole, što je rezultiralo nakupljanjem veće količine vode u oštećenjem zahvaćenoj polutci (233). Povećana propusnost krvno-moždane barijere kod dijabetičnih životinja smatra se rezultatom njenog narušenog integriteta, na što upućuje smanjenje izražaja sastavnih proteina čvrstih spojeva (ZO-1 i kladina-5) te povišen izražaj MMP-9, koja sudjeluje u razgradnji bazalne membrane i međustanične tvari, u odnosu na nedijabetične kontrole (233). Sukladno navedenom, u ovom je istraživanju kod dijabetičnih životinja uočen značajno veći priljev vode u području lezije, što je rezultiralo većim otokom ipsilateralne polutke prvi dan od MCAO zahvata (Slika 18 i 19). Aktivacija bradikininskog signalnog puta primjenom kinina, njihovih analoga ili tkivnog kalikreina povećava propusnost krvno-moždane barijere, pri čemu mogu sudjelovati oba bradikininska receptora (64,239,240). Postoji niz pretkliničkih istraživanja u kojima su farmakološkom inhibicijom B2R-a smanjena propusnost krvno-moždane barijere i razvoj edema u akutnoj fazi nakon MCAO zahvata, međutim istraživanja na B2R-KO miševima dala su oprečne rezultate o ulozi B2R-a u razvoju moždanog edema nakon ishemije, od toga da nedostatak B2R-a štiti od razvoja edema do toga da nema utjecaja na edem (125,163,164,171,172). U navedenim je istraživanjima razmjer nastalog edema određen *post-mortem*, takozvanom suho-mokrom metodom određivanja količine vode u mozgu oduzimanjem mase tkiva nakon sušenja od mase svježe izoliranog tkiva, a koja može biti neprecizna na malim uzorcima (241). Praćenjem razvoja edema nakon MCAO zahvata u živim životinjama MR oslikavanjem, u ovom istraživanju je pokazano da između B2R-KO i WT skupina nije bilo značajne razlike u količini vode u području lezije i otoku ipsilateralne polutke u hiperakutnoj i akutnoj fazi. Međutim, usporedbom promjena koje su nastupile unutar pojedinih skupina između prvog i trećeg dana od MCAO zahvata, pokazano je da kod WT miševa u navedenom razdoblju dolazi do značajnog priljeva vode u područje lezije, što nije slučaj kod B2R-KO miševa, čime je potvrđena uloga B2R-a u narušavanju integriteta krvno-

moždane barijere i poticanju propusnosti u ishemijskom moždanom udaru. Ista razlika nije uočena između dijabetičnih Akita i Akita/B2R-KO skupina, što upućuje na to da razvoj postishemijskog edema u šećernoj bolesti ne ovisi značajno o utjecaju B2R-a na propusnost krvno-moždane barijere. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da šećerna bolest potiče razvoj moždanog edema nakon ishemije, što se očituje većom količinom vode u području lezije te posljedično većim otokom zahvaćene hemisfere. Nadalje, pokazan je i utjecaj B2R-a u poticanju postishemijske vaskularne propusnosti.

U istim vremenskim točkama u kojima su promatrane morfološke promjene nakon MCAO zahvata, životinje su dodatno podvrgnute procjeni neurološkog statusa kako bi se odredio utjecaj šećerne bolesti i nedostataka B2R-a i na funkcionalne promjene izazvane razvojem ishemijske lezije. U prethodnim istraživanjima, veća lezija u šećernoj bolesti uzrokovala je razvoj većeg neurološkog deficita kod dijabetičnih životinja već u akutnoj fazi nakon ishemije (113,234,235). U ovom istraživanju nije bilo razlike u simptomima između dijabetičnih Akita i kontrolnih WT miševa (Slika 20) te se u obje skupine neurološki deficit povećao na treći dan u odnosu na prvi. S druge strane, dijabetični Akita/B2R-KO miševi razvili su značajno veći neurološki deficit od B2R-KO miševa, što je vjerojatno posljedica značajno manjeg otoka zahvaćene polutke kod B2R-KO miševa. Osim toga, za razliku od Akita i WT skupine, Akita/B2R-KO i B2R-KO miševi nisu pokazali povećanje neurološkog deficita na treći dan u odnosu na prvi. Kod B2R-KO miševa je u odnosu na WT miševe u prethodnim istraživanjima pokazano da nema značajne razlike u jačini neurološkog deficita u akutnoj fazi nakon 60-minutne i 90-minutne ishemije, ali je zato nakon 45-minutne ishemije kod B2R-KO miševa uočena značajno bolje očuvana motorička funkcija u odnosu na WT kontrole (125,164,169). U ovom istraživanju, koje je isto bilo karakterizirano kraćom ishemijom (30 minuta) također je pokazano da nedostatak B2R-a ublažava razvoj neurološkog deficita u akutnoj fazi te rezultira značajno boljim neurološkim statusom B2R-KO miševa u odnosu na WT miševe na treći dan. Kod dijabetičnih miševa, usprkos tome što je i ovdje nedostatak B2R-a spriječio progresiju neurološkog deficita na treći dan, u pojedinim vremenskim točkama nisu nađene značajne razlike između skupina.

Kod miševa, kao i kod ljudi, nakon ishemijskog moždanog udara uz funkcionalne promjene često dolazi i do pada tjelesne mase kao posljedice smanjenog unosa hrane i povećanog katabolizma (242). Pokazano je da gubitak tjelesne mase u eksperimentalnim modelima ishemijskog moždanog udara uvelike ovisi o veličini oštećenja, što je u skladu s ovim istraživanjem, gdje je unatoč početnoj razlici u masi i drugačijem glikemijskom statusu

u prva 3 dana nakon MCAO zahvata u svim skupinama zabilježen podjednak pad tjelesne mase od otprilike 15% (243). Time je pokazano da u odabranom modelu ishemijskog moždanog udara težina neurološkog deficita i promjena u tjelesnoj masi nakon MCAO zahvata primarno ovise o veličini nastalog oštećenja te da u slučaju podjednagog oštećenja šećerna bolest ne dovodi do dodatnog pogoršanja neurološkog statusa u akutnoj fazi. S druge strane, nedostatak B2R-a je pokazao na razvoj neurološkog deficita kod nedijabetičnih životinja te u manjoj mjeri i kod dijabetičnih životinja, a koji se očitovao izostankom progresije neurološkog deficita između hiperakutne i akutne faze ishemijske.

6.3. Šećerna bolest mijenja genski i proteinski izražaj bradikininskih receptora u mozgu

Da bradikininski signalni put ima nedvojbenu ulogu u razvoju ishemijske lezije u mozgu ukazuje i činjenica da razina upalnog čimbenika bradikinina u mišjem i štakorskom mozgu naglo raste u prvih 12 sati od nastupa ishemijske, a što prati i privremeni porast u genskom i proteinskom izražaju bradikininskih receptora u akutnoj fazi (125,140,164,244). Povišeni izražaj bradikininskih receptora u šećernoj bolesti, neovisno o ishemijskoj, je do sada zabilježen u mnogim tkivima, ali ne i u mozgu (139,187,194,195). U istraživanju ishemijskog moždanog udara na štakorima kojima je šećerna bolest izazvana primjenom streptozotocina pokazano je da nema razlike u genskom i proteinskom izražaju bradikininskih receptora između dijabetičnih i nedijabetičnih životinja (140). Promijenjeni izražaj bradikininskih receptora kod dijabetičnih štakora u odnosu na nedijabetične kontrole uočen je tek nakon MCAO zahvata, kada je pokazano da je ishemijskom uzrokovan porast u izražaju B1R-a veći, a porast B2R-a manji u prisustvu šećerne bolesti (140). U sličnom istraživanju na miševima, šećerna bolest nije imala značajnog utjecaja na genski izražaj bradikininskih receptora ni prije ni poslije MCAO zahvata (245). Međutim, u oba istraživanja je utjecaj šećerne bolesti na izražaj bradikininskih receptora u mozgu analiziran na temelju uzoraka izoliranih iz lažno operiranih životinja, što nije nužno pravi odraz stanja kod životinja koje prethodno nisu bile izložene bilo kakvom tipu kirurškog zahvata. S obzirom na nekonzistentne rezultate u literaturi, u ovom je istraživanju kvantitativnom PCR analizom uzoraka moždanih polutki prikupljenih u svakoj vremenskoj točki istražen mogući utjecaj šećerne bolesti na izražaj *Bdkrb2* i *Bdkrb1* gena u mozgu prije i nakon ishemijske u Akita modelu. Suprotno prethodnim opažanjima, ovim istraživanjem je pokazano da se izražaj gena za B2R i B1R u mozgu dijabetičnih i nedijabetičnih skupina

značajno razlikuje prije ishemije. Iako je u većini dosad istraženih tkiva pokazano da šećerna bolest potiče izražaj bradikininskih receptora, u mozgu dijabetičnih miševa je izražaj gena za B2R i B1R bio značajno snižen u odnosu na izražaj kod nedijabetičkih kontrola (Slika 21 i 22). Sličan utjecaj šećerne bolesti je prethodno opisan u koštanom tkivu tibije dijabetičnih C57Bl6/J miševa, u kojem je genski izražaj bradikininskih receptora također bio smanjen u odnosu na nedijabetične kontrole, no mogući razlozi zbog kojih šećerna bolest može imati različit utjecaj na izražaj ovisno o tkivu su i dalje nepoznati (246). Kod Akita/B2R-KO i B2R-KO miševa vidljiv je i dodatan utjecaj nedostatka B2R-a na izražaj gena za B1R, koji je u ovim skupinama značajno viši u odnosu na Akita i WT skupinu. Pojačani izražaj B1R-a u nedostatku B2R-a prethodno je pokazan u srcu i bubrezima, a ukazuje na mogući kompenzacijski mehanizam između bradikininskih receptora zbog kojeg je u nedostatku jednog receptora povišen izražaj drugoga (209,247).

U prva tri dana od MCAO zahvata, u ipsilateralnoj polutci dijabetičnih Akita miševa i WT kontrola uočene su značajne promjene u izražaju gena za B2R kao posljedica ishemije. U obje je skupine primijećen porast izražaja gena za B2R prvoga dana od MCAO zahvata, a koji se smanjio na treći dan, što je u skladu s promjenama u izražaju opisanima u prethodnim istraživanjima (125,140,164,244). Iako promjene u izražaju pokazuju sličan trend u obje skupine, vidljive su značajne razlike u njihovom intenzitetu i dinamici kao rezultat utjecaja šećerne bolesti. Na treći dan je izražaj u WT skupini pao na razinu nižu od početne, dok je kod dijabetičnih Akita i dalje bio značajno povišen u odnosu na početno stanje. Ovim istraživanjem je također po prvi puta pokazano da u akutnoj fazi nakon ishemije dolazi do promjena u izražaju gena za B2R i u kontralateralnoj polutci, i to do slabijeg izražaja u WT, a jačeg u dijabetičnih Akita miševa u odnosu na početno stanje.

Izražaj gena za B1R u ipsilateralnoj polutci, slično kao i gena za B2R, raste prvoga dana od MCAO zahvata, i to u svim skupinama, te zatim pada na treći dan, što je također u skladu s promjenama opisanima u prethodnim istraživanjima (140,244). Unatoč promjenama izazvanima ishemijom, izražaj gena za B1R je i dalje bio niži u dijabetičnim skupinama u odnosu na nedijabetične kontrole (Slika 22). Osim toga, značajno veći porast u izražaju gena za B1R nakon ishemije dogodio se u skupinama u kojima nedostaje B2R, i to ne samo u ipsilateralnoj već i u kontralateralnoj polutci, te su razlike u izražaju gena za B1R među tim skupinama postale još izraženije nakon ishemije. U vidu ovih rezultata može se zaključiti da ishemija u akutnoj fazi mijenja genski izražaj bradikininskih receptora u obje moždane polutke. Na genski izražaj oba receptora uz ishemiju dodatno utječe šećerna bolest i nedostatak B2R-a.

Šećerna bolest smanjuje izražaj receptora prije ishemije što se očituje i nižim postishemijskim razinama u odnosu na nedijabetičke kontrole. Nedostatak B2R-a povećava i predishemijski izražaj gena za B1R i njegov postishemijski porast.

To što su šećerna bolest i nedostatak B2R-a doveli do značajnih promjena u izražaju transkripta bradikininskih receptora ne mora nužno značiti da je došlo do promjena i u proteinskom izražaju, s obzirom na to da je korelacija između genskog i proteinskog izražaja kod miševa relativno niska (248). U svrhu provjere utjecaja šećerne bolesti i na proteinski izražaj bradikininskih receptora u ipsilateralnoj moždanoj polutci prije te nakon izazivanja ishemije, određena je integrirana optička gustoća fluorescentnog signala u područjima od interesa na histološkim rezovima obilježenima specifičnim protutijelima za bradikininske receptore. Rezultati istraživanja su pokazali da je proteinski izražaj bradikininskih receptora prije izazivanja ishemije podjednak kod dijabetičnih miševa i njihovih kontrola (Slika 23 i 24). S druge strane, nedostatak B2R-a doveo je do značajnog porasta u proteinskom izražaju B1R-a i kod dijabetičnih i nedijabetičnih miševa. Utjecaj šećerne bolesti na izražaj bradikininskih receptora vidljiv je tek nakon izazivanja ishemije. I kod dijabetičnih Akita i njihovih WT kontrola hiperakutno vidimo porast proteina B2R-a. Međutim, dok se u akutnoj fazi kod WT miševa izražaj vratio na početnu razinu, kod dijabetičnih Akita miševa se dodatno povisio, što ukazuje na to da šećerna bolest potiče povećanje izražaja B2R-a nakon ishemije. U dijabetičnim skupinama je nakon MCAO zahvata također došlo i do značajnog porasta u proteinskom izražaju B1R-a, i to na prvi dan u Akita skupini, a na treći dan u Akita/B2R-KO skupini. S obzirom na to da je B1R opisan kao inducibilan receptor čiji izražaj raste u upalnim stanjima, pomalo je začuđujuće što i kod nedijabetičnih miševa nije došlo do promjene u izražaju nakon ishemije, a koja je opisana u sličnim istraživanjima na nedijabetičnim životinjama (244). Moguće je da su razlike u odnosu na druga istraživanja proizašle iz korištene metode analize i odabranih vremenskih točaka za analizu, te će dodatna istraživanja na ovom modelu ishemije s kroničnom hipoperfuzijom biti potrebna kako bi se istražila ova nekonzistentnost. Porast u izražaju proteina B1R-a uzrokovan nedostatkom B2R-a i dalje je bio prisutan nakon izazivanja ishemije i kod dijabetičnih miševa i kod njihovih kontrola. Može se zaključiti da, iako šećerna bolest sama ne mijenja proteinski izražaj bradikininskih receptora u mozgu miševa, u akutnoj fazi ishemije ona dodatno potiče izražaj B2R-a te inducira izražaj B1R-a. Kompenzacijski mehanizam zbog koje je izražaj gena za B1R povišen u nedostatku gena za B2R prisutan je i na proteinskoj razini, iako njegova pozadina još nije istražena.

6.4. Šećerna bolest potiče gubitak stanica mikroglije uslijed ishemije mozga, a nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 pospješuje njihovo preživljenje

Promjene u mozgu koje se događaju nakon ishemije u velikoj su mjeri posljedica postishemijskog upalnog procesa koji primarno pokreću rezidentne imunološke stanice mikroglije kao odgovor na signale oštećenja u svojoj okolini (92). U ovom istraživanju je po prvi put pokazano da stanice mikroglije u mozgu izražavaju oba bradikininska receptora, prije i nakon ishemije, što ide u prilog njihovoj mogućoj ulozi u staničnoj aktivaciji (Slika 25 i 26), te je stoga provedena ekstenzivna analiza brojnosti i morfologije mikroglije u različitim područjima mozga kako bi se odredio utjecaj šećerne bolesti i nedostatka B2R-a na odgovor stanica mikroglije na ishemiju. U skladu s radovima drugih autora koji u modelima permanentne ishemije ili ishemije s dugotrajnom hipoperfuzijom pokazuju područje lezije kao područje osiromašeno od mikroglije, rezultati utjecaja ishemije na brojnost mikroglije pokazali su da kod miševa divljeg tipa (Slika 27, 29) dolazi do značajnog pada broja stanica mikroglije u području lezije u akutnoj fazi ishemijske ozljede (99,249). Kako je u slučaju akutne ishemije s dugotrajnim poremećajem cerebralne perfuzije metabolizam stanica dugotrajno poremećen, posljedično dolazi do masovne i progresivne smrti stanica, uključujući i mikrogliju (249). Za perilezijsko područje kore karakteristična je značajka mikroglijalne aktivacije ishemijom izazvana prolazna ekspanzija populacije stanica mikroglije u prvom tjednu od ishemije, počevši od trećeg dana (99,249). Međutim, rezultati ovdje provedene analize brojnosti ukazuju na postupno smanjenje broja stanica mikroglije prema trećem danu od zahvata (Slika 28), što može biti djelomično uvjetovano širenjem područja sekundarne lezije u ovom tipu ishemije s dugotrajnom hipoperfuzijom, a djelomično i djelovanjem programirane stanične smrti (84,249). Daljnja istraživanja brojnosti stanica mikroglije s fokusom na kasnije vremenske točke u ovom specifičnom modelu bit će potrebna za određivanje trenutka proliferacije i repopulacije stanica mikroglije u ishemijom zahvaćenoj polutki. Za razliku od perilezijskog područja kore, u perilezijskom području strijatuma nije došlo do promjene u broju stanica (Slika 30). Nadalje, kako je ovim istraživanjem praćen i utjecaj ishemije na kontralateralnu moždanu polutku, po prvi puta je u ovom modelu ishemijske ozljede pokazan postupan, ali značajan pad u brojnosti stanica mikroglije u zrcalnim područjima kontralateralne moždane polutke treći dan od izazivanja ishemije. Brojna bazična i klinička istraživanja pokazuju da ishemijska ozljeda nije ograničena samo na ipsilateralnu ishemijsku polutku, već da osim

fizičkog pritiska od strane ipsilateralne polutke u ekspanziji dolazi i do promjena krvnog protoka, promjene propusnosti krvno-moždane barijere, povećanja stanične smrti i promjena u metabolizmu kontralateralne moždane polutke, što je pojedinačno ili zajedno moglo utjecati i na brojnost stanica mikroglije kontralateralne polutke (250–255).

Rezultati utjecaja ishemije na brojnost stanica mikroglije u dijabetičnih Akita miševa (Slika 27 – 30) pokazali su izrazit pad broja stanica mikroglije u obje polutke u svim regijama. Ovo je u skladu s istraživanjima na životinjama s dijabetesom tipa 2, u kojima zbog kroničnog upalnog stanja izazvanog šećernom bolesti dolazi do većeg gubitka rezidentnih stanica i posljedično veće infiltracije neutrofila (99,107,256,257). Pokazano je da stanice mikroglije mogu spriječiti ulazak imunoloških stanica u moždani parenhim te da smanjenje gustoće stanica mikroglije dovodi do invazije perifernih imunoloških stanica koje povećavaju upalni odgovor (99,258–260). U usporedbi s miševima divljeg tipa, dugotrajno povišene razine šećera u krvi imale su ne samo snažan utjecaj na preživljenje stanica mikroglije u područjima lezije i perilezijskim područjima ipsilateralne moždane polutke svih istraživanih područja, već je taj utjecaj jednako snažno djelovao i na stanice kontralateralne hemisfere (Slike 27 – 30). Kronična upala u šećernoj bolesti iz temelja mijenja ne samo mikroglijalnu staničnu signalizaciju, već i vaskularni endotel. Primjerice, iako nedavna istraživanja pružaju dovoljno dokaza da kontrola glikemije ima velik utjecaj na vaskularni status, koji se može promijeniti čak i nakon relativno kratkih razdoblja hiperglikemije, neposredna terapija inzulinom nakon moždanog udara nije dovoljna za poboljšanje integriteta krvno moždane barijere u pacijenata sa šećernom bolesti (261). Stoga, uz kroničnu hiperglikemiju, upalu i poremećeni vaskularni integritet koji omogućava širenje sekundarnih upalnih čimbenika u nezahvaćenu polutku, ne iznenađuje izrazit pad u brojnosti stanica mikroglije u čitavom mozgu (258,259).

Ovo je prvo istraživanje koje pokazuje utjecaj ishemije na brojnost stanica mikroglije u dijabetičnim Akita miševima s nedostatkom B2R-a, u kojima je, za razliku od Akita miševa, pokazano odgođeno smanjenje broja stanica u akutnoj fazi ishemije u područjima lezije moždane kore i strijatuma (Slike 27, 29). Zanimljivo je i da je, za razliku od Akita miševa, opažen odgođeni i slabiji odgovor zrcalnih regija u kontralateralnoj hemisferi te blaži i postupni odgovor u perilezijskim područjima (Slike 28, 30). Utjecaj nedostatka B2R-a u šećernoj bolesti na odgođenu staničnu smrt stanica mikroglije uslijed ishemije moguće je objasniti time što aktivacija B2R-a pojačava nakupljanje citosolnog i mitohondrijskog Ca^{2+} izazvano smanjenjem ATP-a putem aktivacije fosfolipaze C (260,262). Ovo pojačano nakupljanje Ca^{2+}

povezano je s većim stvaranjem ROS-a, oštećenjem mitohondrija i staničnom smrću. Reaktivni kisikovi radikali mogu inducirati programiranu staničnu smrt djelujući oksidativno na membranske lipide, oštećenjem DNA ili izravnim utjecajem na izražaj gena i proteina uključenih u aktivaciju programirane stanične smrti (262,263). Istraživanje utjecaja ishemije na preživljenje stanica bubrežnih tubula pokazalo je da aktivacija B2R-a pojačava stvaranje ROS-a inducirano smanjenjem dostupnog ATP-a u ishemiji (264). Ishemijom izazvana deplecija ATP-a uzrokuje depolarizaciju stanične membrane, što rezultira priljevom Ca^{2+} u unutarstanični prostor, ali i u već preopterećene mitohondrije otvarajući pore na njihovim membranama, što dovodi do njihovog bubrenja i degradacije. Ovi su događaji nadalje praćeni povećanjem citokroma C, koji cijepa prokaspazu 9 u kaspazu 9, djelujući kao signal za započinjanje programirane stanične smrti (170,262,264,265). Pokazano je da su ovi događaji dodatno stimulirani aktivacijom B2R-a, koji aktivira PLC i rezultira hidrolizom fosfoinozitola u staničnoj membrani i stvaranjem IP3, što povećava otpuštanje Ca^{2+} iz unutarnjih zaliha (266–270). Međutim, aktivacija B2R-a također može povećati unutarstaničnu razinu Ca^{2+} putem kalcijjskih kanala reguliranih naponom te na taj način dodatno utjecati na stvaranje ROS-a i staničnu smrt izazvanu smanjenjem ATP-a (260,270,271).

Temeljem gore navedenog, ne iznenađuje odgovor stanica mikroglije na ishemiju kod miševa s nedostatkom B2R-a (Slike 27, 29), u kojih je došlo do pada u broju stanica prvenstveno u području lezije ipsilateralne moždane polutke, s blagim odgovorom zrcalnih regija kontralateralne moždane polutke. U usporedbi sa životinjama divljeg tipa (Slike 27 – 30), manji pad u broju stanica mikroglije i izrazio slabi odgovor kontralateralne polutke može se objasniti time što nema dodatnog utjecaja B2R-om posredovanog nakupljanja Ca^{2+} , što rezultira smanjenjem stanične smrti posredovane nedostatkom dostupnog ATP-a. Pritom je zanimljivo da je kod dijabetičnih životinja s nedostatkom B2R-a odgovor u padu broja stanica odgođen, ali snažan, dok je kod B2R-KO životinja pad u broju brz, ali puno slabiji (Slike 27 – 30), što bi se djelomično moglo objasniti većom dostupnošću glukoze u dijabetičnih životinja tijekom okluzije, iz koje proizlazi odgoda u odgovoru.

6.5. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 u šećernoj bolesti smanjuje postishemijsku aktivaciju stanica mikroglije mozga

Stanice mikroglije klasično se dijele na tri funkcionalna fenotipa poznata kao nadzorni (M0), proupalni (M1) i protuupalni (M2), a koji se mogu dinamički mijenjati iz jednoga u drugi (272,273). U eksperimentalnom moždanom udaru, mikroglija se aktivira u protuupalno stanje u akutnoj fazi moždanog udara, ali ih ishemijom zahvaćeni neuroni brzo polariziraju u proupalno stanje (274). Međutim, u zadnjih nekoliko godina došlo je do promjene u paradigmi klasične M1/M2 klasifikacije mikroglije u dva polarizacijska stanja te je sada poznato da mikroglija pokazuje širok raspon reakcijskih stanja promjenjivih tijekom vremena (275). Prema novom stajalištu, mikroglija ima brojne uloge, koje se očituju različitim reakcijama definiranim višestrukim morfotipovima, od koji svaki ima vrlo specifičan molekularni potpis. Novi radovi govore u prilog tome da u homeostazi postoje lokalne subpopulacije mikroglije koje djeluju poput transkripcijskog kontinuuma te se brzo prilagođavaju na promjenjive zahtjeve okoline, kao i da odgovor mikroglije ovisi o patologiji, zbog čega se mogu razlikovati sa specifičnom bolešću povezani podtipovi mikroglije (276–278). Međutim, povijesno gledano, fenotipovi mikroglije opisivani su kategoriziranjem stanica na temelju njihovih morfoloških značajki. Koristeći histološke kriterije, stanice mikroglije zdravog odraslog mozga, tj. „rezidentne ili nadzorne“ stanice mikroglije, opisane su kao visoko razgranate stanice s malom okruglom somom. Prilikom aktivacije, stanice mijenjaju orijentaciju, usmjeravajući se prema mjestu oštećenja, te oblik povlačenjem i zadebljanjem staničnih nastavaka, smanjenjem broja nastavaka i povećanjem some. Stoga je između perilezijskog i lezijskog područja moguće naići na niz aktiviranih stanica različitog oblika, od tzv. "hipertrofiranih" i "grmolikih" do "srednje aktiviranih", "bipolarnih" i "štapićastih". U području lezije broj staničnih nastavaka je drastično smanjen, a stanice poprimaju ameboidan oblik koji omogućuje fagocitozu umrlih ili oštećenih stanica (99,249,279). Međutim nepostojanje standarda morfološke klasifikacije komplicira usporedbu podataka različitih istraživanja i onemogućuje objektivnu kvantifikaciju patološkog statusa ili mogućih terapijskih učinaka. Unatoč tome, dobro je poznato da su morfološke značajke i funkcije mikroglije usko povezane i da je razvoj nepristranih kvantitativnih metoda nužan za nove uvide i bolje razumijevanje same paradigme povezanosti morfologije s funkcijom (280–282). S obzirom na heterogenost fenotipa stanica mikroglije među regijama mozga, kao i dodatne promjene nakon ishemije, u ovom je istraživanju napravljena sveobuhvatna automatska i kvantitativna analiza trodimenzionalne morfologije stanica mikroglije u područjima zahvaćenima lezijom, perilezijskim područjima, ali i zrcalnim područjima kontralateralne moždane polutke, kako bismo time dobili sveobuhvatniji odgovor na pitanje utjecaja šećerne bolesti i nedostatka B2R-a na aktivacijski status stanica mikroglije nakon ishemije.

Morfometrijska analiza stanica mikroglije u miševa divljeg tipa (Slike 31 – 34) pokazala je jaču aktivaciju stanica u području lezije kore i strijatuma, ali i nešto blažu aktivaciju stanica u perilezijskim područjima, kompatibilne s reaktivnošću i aktivacijom stanica mikroglije u akutnoj fazi ishemije te sukladne promjenama u aktivnosti stanica mikroglije opisanima u prethodnim istraživanjima (84,99,249,283). Sveukupne morfološke promjene govore o jačem odgovoru stanica mikroglije u području lezije od onog u perilezijskim područjima, obilježenom značajnijim smanjenjem ramifikacijskog indeksa, tj. jačom retrakcijom staničnih nastavaka uz povećanje some, što je u skladu s fagocitnom funkcijom koju te stanice poprimaju kako bi se riješile staničnog debrisa propadajućih neurona izravno zahvaćenih ishemijom. Promjene u reaktivnosti stanica u perilezijskom području idu u prilog prethodnim radovima koji sugeriraju da u ovim područjima dolazi do aktivacije stanica mikroglije kako bi spriječile prekomjernu akumulaciju neutrofila, smanjile utjecaj njihovog upalnog odgovora i na taj način djelovale neuroprotektivno (99). Pritom je zanimljivo da je trećeg dana od izazivanja ishemije zabilježen i odgovor kontralateralne moždane polutke, u kojoj je došlo do blage aktivacije u zrcalnim regijama lezije strijatuma i kore, što je u skladu s prethodnim istraživanjima koja ukazuju na odgovor nezahvaćene moždane polutke na ishemiju (251–256).

U dijabetičnih Akita miševa (Slike 31, 33), morfometrijska analiza stanica mikroglije nakon ishemije pokazuje izrazitu aktivaciju stanica u područjima lezije kore i strijatuma, a koja upućuje na dodatni proces transformacije stanica, ne samo iz aktivnog prema ameboidnom tipu, već i na transformaciju prema distrofičnom obliku, koji je povezan s disfunkcionalnim stanicama (99). Povećanje stanične aktivnosti je jednako tako bilo vidljivo u perilezijskim područjima, dok je u zrcalnim kontralateralnim regijama postupak aktivacije stanica bio postupan te izraženiji na treći dan (Slike 32, 34). Sama hiperglikemija može povećati izražaj proupalnih čimbenika poput CD16 biljega, iNOS-a i TNF- α , koji potiču stanice mikroglije na pretjerani odgovor na sekundarni upalni podražaj (122). Stanice mikroglije perilezijskog područja ishemije u štakorima sa šećernom bolešću pokazale su izrazitu aktivaciju, izrazitije povećanje some i smanjenje nastavaka u usporedbi s kontrolnim nedijabetičkim životinjama, što ukazuje na više stanje aktivacije stanica mikroglije u životinja s dijabetesom (255). Jednako tako je i ovim istraživanjem pokazana značajno jača globalna aktivacija stanica mikroglije u usporedbi sa životinjama divljeg tipa (Slike 31 – 34), podupirući radove koji pokazuju da šećerna bolest, kao kronična upalna bolest, mijenjajući mikrookruženje modulira status stanica

mikroglije i na taj način povećava broj reaktivnih i proupalnih ameboidnih stanica (107,123,124).

Ovo je prvo istraživanje koje pokazuje utjecaj ishemije na aktivacijski status stanica mikroglije u dijabetičnim Akita miševima s nedostatkom B2R-a (Slike 31 – 34). Za razliku od dijabetičnih Akita miševa, kod kojih je zabilježen globalni odgovor stanica mikroglije, kod Akita/B2R-KO miševa aktivacija stanica mikroglije prema ameboidnom tipu zabilježena je samo u područjima lezije kore i strijatuma te perilezijskom strijatumu, ali bez značajnog odgovora perilezijskog područja kore i bez značajnog odgovora kontralateralne moždane polutke. Dosadašnji radovi predlažu protuupalnu ulogu bradikinina i drugih kininskih agonista, koji smanjuju LPS-om induciranu proizvodnju NO-a, TNF- α i citokina IL-1 β putem inhibicije sinteze čimbenika NF- κ B u stanicama mikroglije (284,285). Smanjenje mikroglijalne proizvodnje NO-a i TNF- α od posebne je važnosti, budući da su ove upalne molekule povezane s akutnom proupalnom fazom imunološkog odgovora i izravno povezane sa smrću neurona nakon ishemije. Dodatno, pokazan je dvojak učinak kinina na proizvodnju proupalnog čimbenika prostaglandina u staničnoj kulturi glija stanica (286). Točnije, aktivacija B2R-a povećala je sintezu prostaglandina, dok su agonisti B1R-a inhibirali sintezu ovih upalnih čimbenika, što prema navedenim radovima upućuje na postojanje regulatorne petlje u kojoj B2R posreduje pojačanju upale, ali i povećanju izražaja B1R-a koji djeluje u smjeru smanjenja upale (80,286). Iako oba receptora induciraju povećanje unutarstaničnog Ca²⁺, aktiviraju fosfolipazu C i povezuju se s G-proteinima G α_q , G α_{i2} i G α_{i3} , smatra se da je ovo dvojako djelovanje posredovano time što B2R također može stimulirati razmjenu gvanozin 5'-difosfat / gvanozin 5'-trifosfat (GDP/GTP) putem G $\alpha_{12/13}$, G α_i i G α_s , što nije slučaj za B1R. Stoga, različiti signalni putevi koje koriste B1R i B2R mogu objasniti njihove suprotne učinke. Gore navedeno govori u prilog tome da je nedostatak B2R receptora uz kroničnu upalu uzrokovanu šećernom bolesti prekondicionirao B1R receptor u protuupalno stanje u stanicama mikroglije, zbog čega vidimo manji aktivacijski odgovor stanica mikroglije u perilezijskim područjima i u područjima kontralateralne moždane polutke u odnosu na dijabetične Akita miševe (Slike 31 – 34). Također, dodatno je važno naglasiti da bradikinin inhibira proizvodnju NO-a i sintezu TNF- α putem inhibicije čimbenika NF- κ B tek u uvjetima njihove stimulacije upalom (vidljivo na primjeru LPS-om induciranog upalnog odgovora), što može biti jedan od razloga zbog kojih kod kronične upale u kontralateralnoj moždanoj polutci dijabetičnih Akita/B2RKO miševa, u kojoj postoji prekomjerna proizvodnja proupalnih citokina koja može održavati prisutnost

protuupalno aktivnih B1R receptora, vidimo slabiju aktivaciju stanica mikroglije u odnosu na nedijabetične miševa s nedostatkom B2R-a (Slike 31 – 34).

U nedijabetičkih miševa s nedostatkom B2R-a (Slike 31 – 34) morfometrijska analiza stanica mikroglije nakon ishemije pokazala je aktivaciju stanica u područjima lezije kore i strijatuma te nešto slabiju aktivaciju u perilezijskim područjima ipsilateralne moždane polutke. U lezijskim područjima, usprkos nešto jačem predishemijskom stupnju aktivacije kod miševa s nedostatkom B2R-a, do trećeg dana nema razlike u usporedbi sa životinjama divljeg tipa. Zanimljivo je da u perilezijskim i kontralateralnim područjima vidimo nešto jaču početnu aktivaciju kod miševa s nedostatkom B2R-a naspram životinja divljeg tipa, ali samo u prvom danu nakon ishemije, što se djelomično može objasniti aktivacijom stanica mikroglije s brojnim B1R receptorima prema protuupalnom djelovanju (Slike 31 – 34). Međutim, tri dana od ishemije je aktivacijski status životinja podjednak, uz činjenicu da je broj stanica u miševa divljeg tipa drastično manji. Dodatna *in vivo* istraživanja bit će potrebna kako bi se odredila točna uloga stanica u ovom aktivacijskom statusu.

Iz navedenih rezultata analize brojnosti i morfologije mikroglije može se zaključiti da šećerna bolest uzrokuje veći gubitak stanica mikroglije te pojačanu aktivaciju preostalih stanica u akutnoj fazi nakon ishemije te da njen utjecaj na odgovor stanica mikroglije na ishemiju nije lokaliziran samo na područje lezije već se proteže i na perilezijska područja te zrcalna područja nezahvaćene polutke. Nedostatak B2R-a, s druge strane, pospješuje preživljenje stanica mikroglije nakon ishemije u dijabetičnih i nedijabetičnih životinja. Utjecaj nedostatka B2R-a na aktivaciju mikroglije nakon ishemije se pak razlikuje ovisno o prisustvu šećerne bolesti. Kod nedijabetičnih životinja nedostatak B2R-a dovodi do nešto jače aktivacije stanica u hiperakutnoj fazi perilezijski i u nezahvaćenoj polutci, uz kasnije izjednačavanje odgovora, dok kod dijabetičnih životinja nedostatak B2R-a smanjuje ili u potpunosti sprječava aktivaciju mikroglije u dijelovima perilezijskih područja te zrcalnim regijama nezahvaćene moždane polutke.

6.6. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 ima suprotno djelovanje na ishemijsku nekrozu i edem mrežnice u prisutnosti i odsutnosti šećerne bolesti

Mozak i mrežnica dijele isto embrionalno podrijetlo, ali i mnoge morfološke i fiziološke sličnosti. Velika prednost u praćenju ishemije mrežnice u odnosu na ishemiju mozga je to što

se određene patološke promjene mogu izravno vizualizirati neradiološkim metodama korištenima u klinici, fotografijom i fluoresceinskom angiografijom očne pozadine. Implementacijom ovih metoda u ovo pretkliničko istraživanje određen je utjecaj šećerne bolesti i nedostatka B2R-a na status očne pozadine prije i nakon izazivanja ishemije.

Dijelu životinja je nakon izazivanja ishemije bilo nemoguće odrediti status očne pozadine zbog pojave opacifikacije rožnice i/ili leće (Slika 35). Opacifikacija leće je poznata i dobro dokumentirana reverzibilna pojava tijekom trajanja anestezije kod miševa, pri čemu se od raznih potencijalnih uzroka najvažnijim čimbenikom pokazala suhoća površine oka, odnosno pokazano je kako se pojava opacifikacije može u potpunosti ili u najvećoj mjeri izbjeći pažljivom lubrikacijom oka, a osim toga i kraćim ukupnim trajanjem anestezije (287–289). Osim toga, pojava reverzibilne opacifikacije leće poznata je komplikacija hiperglikemije uslijed akumulacije sorbitola i osmotskog navlačenja vode u leću, s tim da do opacifikacije može doći i uslijed naglog porasta glikemije i uslijed nagle redukcije prethodne hiperglikemije (290,291). Dodatno, klinički je kao rijedak, ali moguć uzrok opacifikacije leće i/ili rožnice opisana i akutna ishemija struktura prednjeg segmenta oka (292). U ovom istraživanju, opacifikacija ipsilateralne rožnice/leće se kod otprilike 20% životinja dijabetičnih skupina pojavila već u hiperakutnoj fazi ishemije, što se u Akita skupini udvostručilo, a u Akita/B2R-KO utrostručilo u akutnoj fazi ishemije (Slika 36). U nedijabetičnim skupinama slučajevi opacifikacije rožnice/leće su se u puno manjoj mjeri pojavili tek u subakutnoj fazi ishemije i to u trostruko više životinja divljeg tipa u odnosu na B2R-KO skupinu. U dijelu životinja iz obje dijabetične skupine, u subakutnoj fazi ishemije došlo je i do opacifikacije rožnice/leće kontralateralnih, ishemijom nezahvaćenih očiju. Kako je već opisano, tijekom snimanja miševa dosljedno je provedena lubrikacija površine oba oka, kao i održavanje tjelesne temperature životinja, a cjelokupno trajanje protokola bilo jednako za sve skupine životinja. Činjenica da je pojava opacifikacije rožnice/leće značajno varirala između skupina, interokularno, ali i ovisno o danu snimanja, kao i da nije bila zabilježena ni na jednom kontralateralnom oku nedijabetičkih životinja, ukazuje na to da je pojava opacifikacije nije bila tehnički artefakt, već posljedica diferencijalnih patofizioloških mehanizama. Pri tome je glikemijski status vjerojatno bio značajan čimbenik, pogotovo budući da je opacifikacija zamijećena i kod dijela kontralateralnih, ishemijom nezahvaćenih očiju kod dijabetičkih životinja.

Znakovi ishemijske nekroze mrežnice, vidljivi kao karakteristična područja opacifikacije posljedična onkotskom edemu i nekrozi mrežnice (293), uočeni su u hiperakutnoj

fazi ishemije u svim skupinama, a isto tako se u svim skupinama u akutnoj fazi učestalost nekrotičnih promjena povećala. Akutni tijek je bio karakteriziran naglim pogoršanjem znakova ishemijske nekroze u dijabetičnoj Akita skupini u odnosu na kontrolnu WT skupinu. U modelu ishemije mrežnice inducirane povećanjem intraokularnog tlaka laserskom fotokoagulacijom trabekularne mreže, primijećeno je da je gubitak ganglijskih stanica mrežnice manji ako je u trenutku indukcije ishemije prisutna hiperglikemija, moguće zato što je zbog povišene razine u krvi tkivu mrežnice dostupnija veća količina glukoze nakon ishemije, što poboljšava preživljenje stanica (294). U ovom istraživanju, odgoda u pojavi nekroze kod dijabetičnih Akita miševa je vjerojatno rezultat sličnog mehanizma, a tome u prilog idu i rezultati dobiveni na dijabetičnim Akita/B2R-KO miševima, koji su imali gori glikemijski status prije indukcije ishemije, ali i manju hiperakutnu i akutnu učestalost nekroze u odnosu na kontrolnu B2R-KO skupinu. Dodatno, Akita/B2R-KO miševi su imali i manju hiperakutnu i akutnu učestalost nekrotičnih promjena i u odnosu na Akita miševe, što ukazuje na to da je u dijabetičnim skupinama nedostatak B2R-a djelovao protektivno. U obje vremenske točke učestalost nekrotičnih promjena mrežnice bila je najveća u B2R-KO skupini. To je u skladu sa pokazanom protektivnom ulogom B2R-a na preživljenje ganglijskih stanica mrežnice pokazanom *in vitro*, gdje je aktivacija B2R-a dodatkom bradikinina djelovala protektivno uslijed inhibicije ekscitotoksičnog djelovanja povišene razine glutamata, kao i *in vivo*, gdje je aktivacija B2R-a dodatkom tkivnog kalikreina kod miševa dovela do boljeg preživljenja ganglijskih stanica nakon ishemije mrežnice (177,178). Unatoč razlikama u statusu očne pozadine na kolornim fotografijama, na fluoresceinskim angiogramima nakon MCAO zahvata ni u jednoj skupini nije zabilježena prisutnost curenja fluoresceina (Slika 38). Navedeno ne znači i da integritet krvno-mrežnične barijere nije bio narušen, budući da je osjetljivost metode ograničena kako činjenicom da je riječ o subjektivnoj, kvalitativnoj metodi, tako i tehnički, ograničenom rezolucijom i kontrastom dobivenih angiograma te mogućom pojavom područja lokalnog defokusa ili konkomitantne patologije poput opacifikacije mrežnice, a koja mogu atenuirati signal i prikriti područja diskretnog curenja kontrasta. Upotreba alternativnih i komplementarnih metoda, poput optičke koherentne tomografije, iako ista ne detektira izravno disfunkciju krvno-mrežnične barijere, u uvjetima otežane vizualizacije osjetljivija je od fluoresceinske angiografije za detektiranje edema (295).

Iz analize statusa očne pozadine na fotografijama fundusa i fluoresceinskim angiogramima, može se zaključiti da šećerna bolest u hiperakutnoj fazi nakon ishemije odgađa pojavu znakova nekroze mrežnice, iako u daljnjem akutnom tijeku nema protektivnog učinka.

Zanimljiv učinak na razvoj ishemije mrežnice u hiperakutnoj i akutnoj fazi ima nedostatak B2R-a, koji štetno utječe na preživljenje stanica u normalnim uvjetima, ali u prisutnosti šećerne bolesti pokazuje protektivan učinak.

Kako bismo dodatno popratili ishemijom izazvane morfološke promjene u samoj mrežnici, ipsilateralno oko je snimljeno *in vivo* magnetskom rezonancijom te je izmjerena debljina mrežnice u 6 točaka od glave ON-a. Prethodno je pokazano da kronična hiperglikemija kod dijabetičnih Akita miševa postupno dovodi do sve veće degeneracije i stanjenja slojeva mrežnice (296), no kako je ovo istraživanje provedeno na mladim životinjama, prije MCAO zahvata nije bilo značajnih razlika u debljini mrežnice između skupina. Nakon MCAO zahvata došlo je do zadebljanja mrežnice u svim mjerenim točkama, što je rezultat razvoja vazogenog edema (Slika 40). Kada su se uzele u obzir sve promatrane točke edem je bio značajno izraženiji kod dijabetičnih Akita miševa u usporedbi s miševima divljeg tipa 3. dan od izazivanja ishemije, što je vjerojatno posljedica povećane propusnosti krvno-mrežnične barijere koja se kod Akita miševa javlja već i u mlađoj dobi (Slika 41) (296). Nedostatak B2R-a je kod dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa atenuirao razvoj edema i rezultirao manjim zadebljanjem mrežnice u odnosu na Akita miševe. Zaštitni utjecaj nedostatka B2R-a na razvoj mrežničnog edema u skladu je s prethodno opisanom ulogom B2R-a u povećanju propusnosti krvno-mrežnične barijere i razvoju edema u šećernoj bolesti (297). Međutim, neočekivani rezultati dobiveni su u nedijabetičnoj B2R-KO skupini, u kojoj je nedostatak B2R-a uzrokovao značajniji edem mrežnice i u odnosu na dijabetičnu Akita/B2R-KO skupinu i u odnosu na miševe divljeg tipa. Štetni utjecaj nedostatka B2R-a na ishemijsko oštećenje mrežnice moguće proizlazi iz istog kompenzacijskog mehanizma bradikininskih receptora i pojačanog izražaja B1R-a koji je potvrđen u mozgu ovih životinja. Za B1R je u više navrata pokazano da povećava propusnost krvno-mrežnične barijere te da potiče infiltraciju leukocita i otpuštanje štetnih medijatora upale u mrežnici (139,198,297,298). Povišeni izražaj B1R-a bi osim toga mogao objasniti zašto i u B2R-KO i Akita/B2R-KO skupini, bez obzira na značajnu razliku u zadebljanju mrežnice, nema znakova rezolucije edema u prijelazu iz hiperakutne u akutnu fazu, a koji su vidljivi u miševima divljeg tipa i dijabetičnim Akita miševima (Slika 40). Iz toga slijedi da šećerna bolest potiče razvoj edema mrežnice nakon ishemije, a nedostatak B2R-a usporava njegovu rezoluciju u akutnoj fazi. Unatoč tome, B2R sveukupno oprečno djeluje na edem kod dijabetičkih i nedijabetičkih životinja. U nedijabetičkim životinjama nedostatak B2R-a pogoršava, dok u dijabetičkim životinjama atenuira razvoj edema mrežnice nakon

ishemije. Dodatna istraživanja bit će potrebna kako bi se odredio točni mehanizam koji mijenja ulogu nedostatka B2R-a u razvoju edema i ishemije mrežnice u prisustvu šećerne bolesti.

6.7. Šećerna bolest mijenja genski izražaj bradikininskih receptora u mrežnici prije i nakon izazivanja ishemije

S obzirom na to da je uloga bradikininskih receptora u ishemiji mrežnice do sada bila slabo istražena, u postojećoj literaturi nema podataka o utjecaju ishemije na izražaj gena za B1R i B2R u mrežnici. Iz toga razloga odrađena je kvantitativna analiza izražaja mRNA za bradikininske receptore u ipsilateralnoj i kontralateralnoj mrežnici nakon ishemijske ozljede, ne samo kako bi se odredila promjena izražaja nakon ishemije već i kako bi se odredio utjecaj šećerne bolesti i nedostatka B2R-a na istu. U istraživanju na streptozotocinskom modelu šećerne bolesti kod štakora pokazano je da je izražaj gena za B1R u mrežnici dijabetičnih životinja povišen, a izražaj gena za B2R nepromijenjen u odnosu na nedijabetične kontrole (297). Ovim istraživanjem je pokazano da je u mišjem Akita modelu dijabetesa tipa 1 izražaj gena za oba receptora povišen u odnosu na miševe divljeg tipa (Slike 42, 43). Osim toga, pokazano je da je u mrežnici, kao i u mozgu, izražaj gena za B1R povišen kod nedijabetičnih miševa s nedostatkom B2R-a. Nakon MCAO zahvata dolazi do značajnih promjena u izražaju bradikininskih receptora u odnosu na početno stanje. U ipsilateralnoj mrežnici miševa divljeg tipa je pod utjecajem ishemije došlo do značajnog hiperakutnog porasta u genskom izražaju B2R-a i nešto slabijeg porasta u genskom izražaju B1R-a, no akutno se izražaj oba receptora vratio na početnu razinu. Kod dijabetičnih miševa je promjena u genskom izražaju nakon ishemije puno značajnija. Nakon MCAO zahvata se izražaj gena za bradikininske receptore kod Akita miševa značajno smanjio, bez naznake ponovnog rasta u akutnoj fazi ishemije. Ganglijski sloj stanica jedno je od primarnih mjesta izražaja bradikininskih receptora u mrežnici (299), a s obzirom na to da je analiza genskog izražaja provedena na uzorcima čitave mrežnice, moguće je da je zabilježeni pad u izražaju gena za B1R i B2R kod Akita miševa s izraženijim razvojem edema rezultat i potencijalno većeg gubitka ganglijskih stanica, za koje je pokazano da su među najosjetljivijom populacijom stanica mrežnice na ishemiju (300). Zbog navedenih se promjena uzrokovanih ishemijom izražaj gena za B1R nakon MCAO u ipsilateralnoj polutci izjednačio kod dijabetičnih i nedijabetičnih miševa, dok je izražaj gena za B2R i dalje bio viši u Akita skupini. Zanimljivo je da je kod dijabetičnih i kontrolnih miševa bez funkcionalnog B2R-a promjena u izražaju gena za B1R vidljiva tek u akutnoj fazi ishemije,

kada dolazi do porasta u izražaju kod dijabetičnih Akita/B2R-KO miševa i ,oprečno tome, pada kod njihovih B2R-KO kontrola, što je u skladu s većim oštećenjem mrežnice koje je primijećeno kod B2R-KO miševa. Stoga je kvantitativnom PCR analizom pokazano da nakon ishemije normalno dolazi do porasta u genskom izražaju bradikininskih receptora u mrežnici te da se taj odgovor mijenja u prisustvu šećerne bolesti i/ili u nedostatku B2R-a. Šećerna bolest potiče povećanje izražaja gena za bradikininske receptore u mrežnici prije ishemije, ali nakon ishemije dovodi do pada, a ne porasta u izražaju, dok nedostatak B2R-a dovodi do pojačanog izražaja gena za B1R, ne mijenjajući trend odgovora na ishemiju, osim u šećernoj bolesti, gdje dodatno raste uslijed ishemije. Ovim je istraživanjem pokazano i da indukcija ishemije u ipsilateralnom oku također dovodi do transkripcijskih promjena u ishemijom nezahvaćenom kontralateralnom oku. To je još jedan dokaz da unilateralno oštećenje mrežnice može rezultirati upalnim promjenama i u kontralateralnoj mrežnici te da, iz tog razloga, a kako je istaknuto i u nedavnom preglednom radu, u ovakvom i sličnim istraživanjima kontralateralna mrežnica nije uvijek prikladna kontrola (301).

6.8. Nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 u šećernoj bolesti smanjuje postishemijsku aktivaciju stanica mikroglije mrežnice

Aktivacija mikroglije uslijed ishemije, uočena u brojnim neurološkim poremećajima, opisana je i u ishemiji mrežnice. Kako aktivacija stanica mikroglije može imati dvojako djelovanje, proučavana je u različitim modelima degeneracije mrežnice poput glaukoma ili u različitim ishemijsko-reperfuzijskim modelima (302–307). Međutim, aktivacijski status mikroglije do ovog istraživanja nije opisan u modelu ishemije s kroničnom hipoperfuzijom, kao ni modulacija aktivacijskog statusa stanica mikroglije šećerenom bolesti u tom modelu. Također, u ovom istraživanju je pokazano da stanice mikroglije u mrežnici izražavaju oba bradikininska receptora, no njihova uloga i utjecaj njihove modulacije šećernom bolesti na aktivacijski status mikroglije do sada su bili nepoznati. Stoga je analiziran odgovor nadzornih stanica mikroglije mrežnice te modulacija njihovog statusa uslijed šećerne bolesti i nedostatka B2R-a prije i nakon izazivanja ishemijsko-hipoperfuzijske ozljede.

Morfometrijska analiza stanica mikroglije mrežnica miševa divljeg tipa (Slike 44, 45) u hiperakutnoj fazi ishemije pokazala je izrazitu promjenu fenotipa poprimanjem odlika aktiviranih stanica „prijelaznog“ štapićastog morfolitpa, smještenih u unutrašnjem zratom

sloju i sloju ganglijskih stanica (Slike 44, 45). U akutnoj fazi bili su prisutni ili hiperazgranati oblik ili ameboidni oblik koji se nalazio primarno u sloju ganglijskih stanica. U modelu laserom inducirane ozljede mrežnice pokazano je migracijsko ponašanje kako hiperazgranate tako i ameboidne mikroglije tijekom dužeg vremenskog perioda, ali i dinamičan proces promjene kroz različite vrste morfotipa ovisne o vremenu od ozljede (75,308). To je pokazano i ovim istraživanjem, gdje vidimo ne samo različite stupnjeve aktivacije tijekom hiperakutne i akutne faze već i migraciju stanica kroz unutarnje slojeve mrežnice. Epizode prolazne i lokalizirane aktivacije mikroglije mrežnice ovisne su o okolišnim signalima te, jednako kao i u mozgu, razgranata mikroglija može postati prolazno hiperrazgranata produženjem i povećanjem broja svojih nastavaka u odgovoru na početni utjecaj iz okoliša, a zatim se brzo pretvoriti u aktivirani morfotip povećane some i zadebljanih nastavaka ako dođe do značajnih poremećaja (309). Aktivirana mikroglija prilikom velikog oštećenja poput ishemijskog nastavlja se prilagođavati zahtjevima okoliša pretvorbom u ameboidni tip potpunim povlačenjem nastavaka i dodatnim povećanjem pokretne some, što omogućuje brzu migraciju i fagocitozu umirućih neurona i staničnog debrisa (309). Osim ameboidne mikroglije, u modelima degenerativnih bolesti mrežnice poput glaukoma opisana je i „štapićasta“ mikroglija, izrazito uskih i izduženih stanica s malom citoplazmom i nekoliko nastavaka, koja je povezana s gubitkom ganglijskih stanica i degeneracijom aksona (310,311).

U dijabetičnih Akita miševa, prije izazivanja ishemije je, osim rezidentnih razgranatih stanica s normalnom raspodjelom, bilo vidljivo i ponešto stanica štapićastog fenotipa aktiviranih uslijed izražene šećerne bolesti. Nakon zahvata je, za razliku od nalaza kod miševa divljeg tipa, većina stanica pokazala izraziti aktivacijski stupanj uslijed sekundarne ozljede te su stanice poprimile štapićasti ili ameboidni fenotip, a što je u skladu s drugim radovima koji na primjeru animalnih modela dijabetičke retinopatije pokazuju povećanje aktivnosti stanica mikroglije, hipertrofiju, i povećanje broja stanica primarno ameboidnog fenotipa u unutrašnjim slojevima, uključujući sloj ganglijskih stanica (309,312,313). Također je u drugim radovima pokazana promjena u izražaju različitih upalnih čimbenika poput CD11b, IL-1 β , IL-6 i TNF- α povezanih s vaskularnom propusnosti, poremećajem funkcije neuronska i neovaskularizacijom te značajna korelacija promjene tih upalnih čimbenika s ameboidnom aktiviranom mikroglijom, apoptozom i fagocitnom funkcijom (309,312–317).

Zanimljivo je da je kod dijabetičnih Akita životinja s nedostatkom B2R-a šećerna bolest prije ishemije aktivirala stanice mikroglije prema hiperrazgranatom, vjerojatno protuupalnom

fenotipu aktivacijom izrazito izraženog B1R-a, za razliku od dijabetičnih Akita životinja, kod kojih su aktivirane stanice bile štapićastog tipa, a koji je prethodno pokazan proupalnim i neurodegenerativnim (309). S obzirom na relativno mladu dob korištenih životinja, bit će potrebna dodatna istraživanja kako bi se odredilo na koji način starenje i patološke promjene uslijed istoga utječu na ponašanje stanica mikroglije u ovih životinja. Nakon zahvata, kod Akita/B2R-KO životinja postojala je značajna razlika u odgovoru mikroglije između hiperakutne i akutne faze, gdje je hiperakutno većina stanica poprimila ameboidni morfotip, dok je u akutnoj fazi većina stanica bila hiperrazgranatog morfotipa. Hiperakutno dakle vidimo podjednak odgovor stanica mikroglije kao u Akita životinja, ali akutno dolazi do razlika u odgovoru (Slike 44, 45). Međutim, dodatna istraživanja bit će potrebna kako bi se dokazalo je li kronična upala uzrokovana šećernom bolešću prekondicionirala stanice mikroglije u protuupalno stanje aktivacijom B1R-a te posljedično smanjila lučenje NO-a, TNF- α i IL-1 β , kao i je li zbog toga uočena promjena morfologije od ameboidnog prema hiperrazgranatom morfotipu.

U B2R-KO skupini prije izazivanja ishemije nije bilo razlika u aktivacijskom statusu i raspodjeli stanica u odnosu na miševe divljeg tipa (Slike 44, 45). U hiperakutnoj fazi većina stanica je poprimila zgusnuti štapićasti ili ameboidni morfotip, uz nešto obilniju raspodjelu u vanjskom mrežastom sloju, dok je u akutnoj fazi prevladavao hiperrazgranati oblik uz dosta stanica ameboidnog morfotipa. Uz nedostatak prethodnih radova o ulozi B2R-a na status mikroglije mrežnice nakon ishemije, oslanjajući se samo na *in vivo* rezultate ovoga istraživanja, djeluje očitom uloga nedostatka B2R-a u povećanju izražaja B1R-a, a čija je aktivacija uslijed ishemije utjecala na povećanje propusnosti i izrazito stvaranje mrežničnog edema te je povećana aktivacija mikroglije u ovim miševima sukladna snažnom upalnom odgovoru vaskulature i većem gubitku ganglijskih stanica.

Usporedbom promjena u morfologiji između skupina može se zaključiti da šećerna bolest aktivira stanice mikroglije u mrežnici prije izazivanja ishemije te da nakon ishemije izaziva nagli prijelaz stanica u visoko aktivacijsko stanje obilježeno ameboidnim i štapićastim oblikom stanica. Šećerna bolest i u nedostatku B2R-a aktivira mikrogliju prije ishemije, ali prema naizgled drugačijem fenotipu koji je obilježen hiperrazgranatim oblikom stanica i čiji je prelazak u ameboidni i štapićasti oblik nakon ishemije kraći te se u akutnoj fazi ponovno vraća u hiperrazgranati. U nedostatku B2R-a kod nedijabetičnih životinja, u hiperakutnoj fazi nakon ishemije također prevladava ameboidni i štapićasti oblik, uz hiperrazgranati i ameboidni oblik

u akutnoj fazi, a pojačana aktivacija u odnosu na divlji tip je u skladu s izraženijim upalnim odgovorom, izrazitim edemom i izraženijom ishemijskom nekrozom mrežnice u ovoj skupini.

6.9. Šećerna bolest mijenja ulogu bradikinskog receptora tipa 2 u postishemijskom upalnom odgovoru mozga i mrežnice

U pretkliničkim istraživanjima postoji niz različitih, ali zasebnih modela ishemijskog moždanog udara i ishemije mrežnice. Međutim, naša grupa je pokazala da u Koizumi modelu okluzije srednje moždane arterije, koji se godinama isključivo koristio kao model ishemije mozga, istovremeno dolazi i do ishemije ipsilateralne mrežnice te da promjene u tkivu izazvane ishemijom, poput razvoja edema u akutnoj fazi i gubitka tkiva u kroničnoj fazi, imaju jednaki vremenski slijed u mozgu i u mrežnici (232). Korištenje navedenog modela u ovom istraživanju omogućilo nam je paralelno praćenje utjecaja šećerne bolesti i nedostatka B2R-a na akutnu fazu razvoja ishemijske lezije u mozgu i u mrežnici.

U ovom modelu, šećerna bolest u akutnoj fazi nije značajno utjecala na preživljenje, veličinu ishemijske lezije u mozgu ni na razvoj neurološkog deficita. Međutim, njen štetni utjecaj na razvoj ishemijske lezije mozga, koji je prethodno pokazan i u životinjskim modelima i kod ljudi (104,106), ovdje se očitovao pojačanim nakupljanjem vode u području lezije, većim otokom zahvaćene polutke te izraženijom promjenom volumena polutke. U šećernoj bolesti je uz pojačani razvoj edema istovremeno primijećen i značajan gubitak nadzornih stanica mikroglije te izrazita aktivacija preostalih stanica u obje moždane polutke. Za šećernu je bolest pokazano da potiče povećanje genskog izražaja bradikininskih receptora u mozgu prije ishemije te da značajno utječe na genski i na proteinski izražaj bradikininskih receptora nakon ishemije. Nedostatak B2R-a u dijabetičnim životinjama u akutnoj fazi nije utjecao na preživljenje, volumen lezije ili razvoj edema. Iako morfološki nisu uočene značajne promjene u odnosu na dijabetičke životinje, nedostatak B2R-a je kod dijabetičnih životinja ublažio razvoj neurološkog deficita. Uz to, nedostatak B2R-a je promijenio odgovor mikroglije na ishemiju kod dijabetičnih životinja tako što je smanjio pad u broju stanica mikroglije te spriječio njenu aktivaciju u perilezijskim područjima i nezahvaćenoj moždanoj polutci. S obzirom na to da mikroglija, ovisno o fenotipu, može imati i zaštitni i štetni utjecaj na razvoj ishemijske lezije, daljnja istraživanja su potrebna kako bi se odredilo na koji način navedene promjene u njenoj brojnosti i aktivaciji u akutnoj fazi u ovim skupinama utječu na kronični oporavak tkiva (102).

Nedostatak B2R-a u odsutnosti šećerne bolesti, za koji u postojećim istraživanjima još uvijek nema konsenzusa o sveukupnom štetnom ili zaštitnom djelovanju u razvoju ishemijske lezije mozga, pokazao je naznaku povoljnog utjecaja na preživljenje životinja i povoljan utjecaj na vaskularnu propusnost u akutnoj fazi ishemije. Uz to, životinje s nedostatkom B2R-a su pokazale i bolje preživljenje stanica mikroglije uslijed ishemije te njihovu pojačanu aktivaciju u perilezijskim područjima u odnosu na životinje divljeg tipa. Navedene promjene rezultirale su značajno boljim neurološkim statusom B2R-KO životinja u akutnoj fazi ishemije u odnosu na životinje divljeg tipa.

U akutnoj fazi ishemije otok ipsilateralne moždane polutke istovremeno prati i zadebljanje mrežnice, što je u oba slučaja posljedica razvoja vazogenog edema. Šećerna bolest je i u mrežnici pokazala štetni utjecaj na razvoj ishemijske lezije, potičući razvoj edema te ishemijsku nekrozu mrežnice u odnosu na životinje divljeg tipa. Uslijed šećerne bolesti pokazana je i proupalna aktivacija stanica mikroglije prije indukcije ishemije, vidljiva iz promjene stanica u štapičasti neurodegenerativni morfotip. Izrazita aktivacija stanica mikroglije prema proupalnom ameboidnom fenotipu uslijed ishemije uočena u mozgu pokazana je i u ishemiji mrežnice. Iako je šećerna bolest negativno utjecala na razvoj ishemijske ozljede u oba tkiva, njen utjecaj na genski izražaj bradikininskih receptora se razlikovao u mozgu i mrežnici. Uslijed šećerne bolesti genski izražaj bradikininskih receptora mrežnice bio je povišen u odnosu na izražaj u miševa divljeg tipa prije i nakon ishemije, čak i usprkos tome što je kod dijabetičnih Akita miševa nakon ishemije uočen pad u izražaju, a kod miševa divljeg tipa porast.

Nedostatak B2R-a je u dijabetičnim životinjama značajno smanjio pojavu ishemijske nekroze mrežnice i razvoj edema, ali i odgodio rezoluciju edema. Utjecaj šećerne bolesti na aktivaciju mikroglije mrežnice uočen je i u dijabetičnih životinja s nedostatkom B2R-a, ali se vidjela razlika u aktivacijskom statusu u odnosu na dijabetičnu Akita skupinu. Aktivirane stanice mikroglije u mrežnici Akita/B2R-KO životinja su prije ishemije bile pretežito hiperrazgranatog izgleda koji upućuje na protuupalni fenotip, za razliku od štapičastog izgleda kod Akita miševa, koji upućuje na proupalni neurodegenerativni fenotip (309). Nakon ishemije, mikroglija se u prisustvu šećerne bolesti aktivirala prema ameboidnom morfotipu, ali se u nedostatku B2R-a takva aktivacija zadržala samo u hiperakutnoj fazi te se akutno mikroglija vratila prema hiperrazgranatom morfotipu.

Iznenadujuće je otkriće da nedostatak B2R-a kod nedijabetičnih miševa, za razliku od miševa sa šećernom bolesti, ima suprotan učinak u akutnoj fazi ishemije mozga i mrežnice. U nedostatku B2R-a kod nedijabetičnih životinja došlo je do značajnog povećanja učestalosti ishemijskih nekrotičnih promjena mrežnice, pojačanog razvoja edema, ali i odgođene rezolucije edema, kao i povećane aktivacije stanica mikroglije. Zanimljivo je da se štetni utjecaj nedostatka B2R-a na razvoj ishemijske ozljede mrežnice nedijabetičnih životinja nije očitovao kod dijabetičnih životinja.

Iz ovoga proizlazi da nedostatak B2R-a akutno ima zaštitni utjecaj na razvoj ishemijske ozljede mozga i mrežnice u šećernoj bolesti. Zaštitni utjecaj je nešto izraženiji u mrežnici, ali će buduća istraživanja biti potrebna kako bi se razjasnila drugačija uloga B2R-a u akutnoj fazi razvoja ishemijske ozljede mozga i mrežnice nedijabetičnih životinja te istražilo kako uočene razlike utječu na kroničnu fazu ishemije, regeneraciju i oporavak tkiva.

7. ZAKLJUČAK

Istraživanjem utjecaja šećerne bolesti na ulogu bradikininskog signalnog puta u razvoju edema te odgovoru mikroglije u mišjem modelu ishemijske ozljede mozga i mrežnice zaključeno je sljedeće:

1. Fiziološka mjerenja provedena na Akita miševima s dijabetesom tipa 1, miševima s dijabetesom tipa 1 i s onemogućenim genom za bradikininski receptor tipa 2 i njihovim nedijabetičnim kontrolama pokazala su da u miševa sa šećernom bolesti nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 pogoršava glikemijski status i sprječava razvoj povišenog intraokularnog tlaka.
2. *In vivo* praćenjem razvoja cerebralne ishemijske lezije nakon okluzije srednje moždane arterije magnetskom rezonancijom te procjenom težine neurološkog deficita pokazan je štetan utjecaj šećerne bolesti, koja u akutnoj fazi pojačava razvoj postishemijskog moždanog edema. Pri tome nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 umanjuje razvoj postishemijske vaskularne propusnosti samo u odsutnosti šećerne bolesti, dok razvoj akutnog neurološkog deficita umanjuje dijelom i u prisutnosti šećerne bolesti.
3. Određivanjem relativnog izražaja mRNA i proteina bradikininskih receptora u obje moždane polutke pokazano je da je u šećernoj bolesti genski izražaj bradikininskih receptora u mozgu prije ishemije smanjen, a proteinski izražaj nepromijenjen. U akutnoj fazi nakon izazivanja ishemije šećerna bolest dodatno utječe na promjenu genskog, ali i proteinskog izražaja bradikininskih receptora.
4. Analizom broja stanica mikroglije pokazano je da u ovom modelu cerebralna ishemija u akutnoj fazi uzrokuje njihov značajan gubitak u području lezije, kao i u određenim dijelovima perilezijskog područja i kontralateralne polutke. Pri tome šećerna bolest pojačava gubitak stanica mikroglije u obje polutke, dok nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 pospješuje njihovo preživljenje.

5. Kvantitativnom analizom trodimenzionalne morfologije stanica mikroglije u mozgu prije i nakon ishemije pokazane su značajne promjene u morfotipu mikroglije u području lezije, ali i nešto blaže promjene u perilezijskim područjima te kontralateralnoj moždanoj polutci, a koje ukazuju na aktivaciju stanica mikroglije u akutnoj fazi ishemije. Pri tome šećerna bolest snažno aktivira stanice mikroglije uslijed ishemije, dok nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 u šećernoj bolesti umanjuje njihovu aktivaciju.
6. *In vivo* praćenjem razvoja ishemijske lezije mrežnice nakon okluzije pterigopalatine arterije snimanjem ipsilateralnog oka magnetskom rezonancijom te fotografijom i fluoresceinskom angiografijom očne pozadine pokazano je da šećerna bolest kratkotrajno odgađa ishemijsku nekrozu, ali pogoršava edem mrežnice u akutnoj fazi, dok nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 smanjuje ishemijsku nekrozu i edem mrežnice u životinja sa šećernom bolesti, ali pogoršava iste kod nedijabetičnih životinja.
7. Određivanjem relativnog izražaja mRNA bradikininskih receptora u mrežnici pokazano je da je genski izražaj bradikininskih receptora u mrežnici prije ishemije povišen u prisutnosti šećerne bolesti. Šećerna bolest dodatno utječe i na promjenu genskog izražaja bradikininskih receptora u mrežnici u akutnoj fazi nakon izazivanja ishemije.
8. Morfometrijska analiza stanica mikroglije mrežnice pokazala je u akutnoj fazi ishemije izrazitu promjenu morfotipa koja ukazuje na njihovu aktivaciju. Pri tome šećerna bolest pojačava aktivaciju stanica mikroglije uslijed ishemije mrežnice, dok nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 u šećernoj bolesti umanjuje njihovu aktivaciju.
9. U odsutnosti šećerne bolesti nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 ima zaštićen učinak na akutnu fazu razvoja ishemijske lezije mozga, ali štetan učinak na akutnu fazu razvoja ishemijske lezije mrežnice. U prisutnosti šećerne bolesti, ti učinci su značajno izmijenjeni, što ukazuje na to da šećerna bolest mijenja ulogu bradikininskog receptora tipa 2 u postishemijskom upalnom odgovoru mozga i mrežnice.

8. SAŽETAK

Šećerna bolest, kao učestali komorbiditet u podlozi ishemije mozga i mrežnice, mijenja izražaj bradikininskih receptora uključenih u postishemijski upalni odgovor. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti kako šećerna bolest utječe na ulogu signalnog puta bradikinina u razvoju edema te aktivaciji i migraciju mikroglije u mišjem modelu ishemijske ozljede mozga i mrežnice. Miševima s dijabetesom tipa 1, dijabetičnim miševima s onemogućenim genom za bradikininski receptor tipa 2 te njihovim nedijabetičnim kontrolama inducirana je ishemija simultanom okluzijom srednje moždane i pterigopalatine arterije. Rezultati pokazuju uključenost bradikininskog receptora tipa 2 u metabolizam glukoze i razvoj očne hipertenzije u dijabetičnih miševa. Pokazuju i da šećerna bolest različito modulira izražaj bradikininskih receptora u mozgu i mrežnici, pojačava razvoj moždanog i mrežničnog edema, postishemijsku aktivaciju stanica mikroglije i gubitak istih, dok nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 u šećernoj bolesti smanjuje odgovor mikroglije, progresiju neurološkog deficita i edem mrežnice. U odsutnosti šećerne bolesti, nedostatak bradikininskog receptora tipa 2 smanjuje vaskularnu propusnost mozga i pospješuje preživljenje mikroglije, ali istovremeno pojačava postishemijski edem mrežnice i aktivaciju mikroglije. Ovim radom je pokazano da šećerna bolest mijenja ulogu bradikininskog receptora tipa 2 u postishemijskom upalnom odgovoru mozga i mrežnice te ukazuje na važnost uključenja komorbiditeta u pretklinička istraživanja ishemijskog moždanog udara.

9. SUMMARY

The effects of diabetes mellitus on edema development and microglial response in a mouse model of cerebral and retinal ischemia via modulation of bradykinin receptors expression

Anja Barić

2023.

Diabetes mellitus, underlying brain and retinal ischemia, changes the expression of bradykinin receptors in the postischemic inflammatory response. The aim of this research was to determine how diabetes modulates the role of bradykinin signalling pathway in edema development and microglial response in a mouse model of cerebral and retinal ischemia. Ischemia was induced by simultaneous occlusion of the middle cerebral and pterygopalatine arteries in type 1 diabetic mice, bradykinin receptor type 2 knock-out diabetic mice, and their non-diabetic controls. The results show the involvement of bradykinin receptor type 2 in glucose metabolism and ocular hypertension development in diabetic mice. Diabetes changes the expression of bradykinin receptors in the brain and retina differently, enhances brain and retinal edema development, postischemic activation and loss of microglia, while bradykinin receptor type 2 deficiency in diabetes reduces the microglial response, retinal edema, and progression of neurological deficit. In normoglycemia, bradykinin receptor deficiency reduces cerebral vascular permeability and promotes microglial survival, but at the same time enhances retinal edema formation and microglial activation. This work has shown that diabetes changes the role of bradykinin receptor type 2 in postischemic inflammatory response and underlines the importance of the inclusion of comorbidities in preclinical stroke research.

10. LITERATURA

1. Mambiya M, Shang M, Wang Y, Li Q, Liu S, Yang L, i sur. The Play of Genes and Non-genetic Factors on Type 2 Diabetes. *Front Public Health*. 2019;7:349-57.
2. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, i sur. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;138:271–81.
3. Dabelea D, Mayer-Davis EJ, Saydah S, Imperatore G, Linder B, Divers J, i sur. Prevalence of Type 1 and Type 2 Diabetes Among Children and Adolescents From 2001 to 2009. *JAMA*. 2014;311(17):1778-86.
4. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*. 2005;365(9467):1333–46.
5. Meyer C, Stumvoll M, Nadkarni V, Dostou J, Mitrakou A, Gerich J. Abnormal renal and hepatic glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Investig*. 1998;102(3):619–24.
6. Dinneen S, Gerich J, Rizza R. Carbohydrate Metabolism in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*. 1992;327(10):707–13.
7. LeRoith D. β -cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities. *Am J Med*. 2002;113(6):3–11.
8. Christensen AA, Gannon M. The Beta Cell in Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep*. 2019;19(9):81.
9. Lawrence RL, Wall CR, Bloomfield FH. Prevalence of gestational diabetes according to commonly used data sources: an observational study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2019;19(1):349.
10. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*. 2010;464(7293):1293–300.
11. Lorenzen T, Pociot F, Hougaard P, Nerup J. Long-term risk of IDDM in first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetologia*. 1994;37(3):321–7.
12. Harjutsalo V, Sjöberg L, Tuomilehto J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *The Lancet*. 2008;371(9626):1777–82.
13. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799–806.
14. Bonora E, Trombetta M, Dauriz M, Travia D, Cacciatori V, Brangani C, i sur. Chronic complications in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: prevalence and related metabolic and clinical features: the Verona Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Study (VNDS) 9. *BMJ Open Diabetes Res Care* [Internet]. 2020 [pristupljeno 4.6.2022.];8(1): e001549. Dostupno na: <https://drc.bmj.com/content/8/1/e001549.long>

15. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest*. 2001;108(9):1341–8.
16. Suryavanshi S, Kulkarni YA. NF- κ B: A Potential Target in the Management of Vascular Complications of Diabetes. *Front Pharmacol*. 2017;8:798.
17. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers. *The FASEB Journal*. 1995;9(10):899–909.
18. Maida CD, Daidone M, Pacinella G, Norrito RL, Pinto A, Tuttolomondo A. Diabetes and Ischemic Stroke: An Old and New Relationship an Overview of the Close Interaction between These Diseases. *Int J Mol Sci*. 2022;23(4):2397.
19. Kannel WB. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA*. 1979;241(19):2035–8.
20. Chang YS, Ho CH, Chu CC, Wang JJ, Tseng SH, Jan RL. Risk of retinal artery occlusion in patients with diabetes mellitus: A retrospective large-scale cohort study. *PLoS One* [Internet]. 2018 [pristupljeno 4.6.2022.];13(8):e0201627. Dostupno na: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0201627>
21. Icks A, Claessen H, Morbach S, Glaeske G, Hoffmann F. Time-Dependent Impact of Diabetes on Mortality in Patients With Stroke. *Diabetes Care*. 2012;35(9):1868–75.
22. Kiers L, Davis SM, Larkins R, Hopper J, Tress B, Rossiter SC, i sur. Stroke topography and outcome in relation to hyperglycaemia and diabetes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992;55(4):263–70.
23. Jones TH, Morawetz RB, Crowell RM, Marcoux FW, FitzGibbon SJ, DeGirolami U, i sur. Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J Neurosurg*. 1981;54(6):773–82.
24. Heinsius T, Bogousslavsky J, van Melle G. Large infarcts in the middle cerebral artery territory. Etiology and outcome patterns. *Neurology*. 1998;50(2):341–50.
25. Ng YS, Stein J, Ning M, Black-Schaffer RM. Comparison of Clinical Characteristics and Functional Outcomes of Ischemic Stroke in Different Vascular Territories. *Stroke*. 2007;38(8):2309–14.
26. Gattringer T, Posekany A, Niederkorn K, Knoflach M, Poltrum B, Mutzenbach S, i sur. Predicting Early Mortality of Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 2019;50(2):349–56.
27. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol*. 1994;36(4):557–65.
28. Minnerup J, Wersching H, Teuber A, Wellmann J, Eyding J, Weber R, i sur. Outcome After Thrombectomy and Intravenous Thrombolysis in Patients With Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 2016;47(6):1584–92.
29. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, i sur. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A

Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2018;49(3):46-110.

30. Henderson SJ, Weitz JI, Kim PY. Fibrinolysis: strategies to enhance the treatment of acute ischemic stroke. *J Thromb Haemost*. 2018;16(10):1932–40.

31. Gurewich V. Fibrinolytic Mechanisms of tPA, prouPA, Mutant prouPA and Their Implications for Therapeutic Thrombolysis. *Cardiovasc Eng Technol*. 2013;4(4):328–38.

32. Nour M, Scalzo F, Liebeskind DS. Ischemia-Reperfusion Injury in Stroke. *Interv Neurol*. 2012;1(3–4):185–99.

33. Hervella P, Rodríguez-Castro E, Rodríguez-Yáñez M, Arias S, Santamaría-Cadavid M, López-Dequidt I, i sur. Intra- and extra-hospital improvement in ischemic stroke patients: influence of reperfusion therapy and molecular mechanisms. *Sci Rep*. 2020;10(1):3513.

34. Osborne NN, Casson RJ, Wood JPM, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res*. 2004;23(1):91–147.

35. Dattilo M, Newman NJ, Biousse V. Acute retinal arterial ischemia. *Ann Eye Sci*. 2018;3:28.

36. Park SJ, Choi NK, Seo KH, Park KH, Woo SJ. Nationwide Incidence of Clinically Diagnosed Central Retinal Artery Occlusion in Korea, 2008 to 2011. *Ophthalmology*. 2014;121(10):1933–8.

37. Kuwabara T, Cogan DG. Retinal Glycogen. *Arch Ophthalmol*. 1961;66(5):680–8.

38. Weiss H. The Carbohydrate Reserve in the Vitreous Body and Retina of the Rabbit's Eye during and after Pressure Ischaemia and Insulin Hypoglycaemia. *Ophthalmic Res*. 1972;3(6):360–71.

39. London A, Benhar I, Schwartz M. The retina as a window to the brain—from eye research to CNS disorders. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(1):44–53.

40. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A, i sur. An Updated Definition of Stroke for the 21st Century. *Stroke*. 2013;44(7):2064–89.

41. Campbell BC, de Silva DA, Macleod MR, Coutts SB, Schwamm LH, Davis SM, i sur. Ischaemic stroke. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):70.

42. Du F, Zhu XH, Zhang Y, Friedman M, Zhang N, Uğurbil K, i sur. Tightly coupled brain activity and cerebral ATP metabolic rate. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(17):6409–14.

43. Katayama Y, Kawamata T, Tamura T, Hovda DA, Becker DP, Tsubokawa T. Calcium-dependent glutamate release concomitant with massive potassium flux during cerebral ischemia in vivo. *Brain Res*. 1991;558(1):136–40.

44. Choi DW. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett*. 1985;58(3):293–7.

45. Tymianski M, Tator CH. Normal and Abnormal Calcium Homeostasis in Neurons: A Basis for the Pathophysiology of Traumatic and Ischemic Central Nervous System Injury. *Neurosurgery*. 1996;38(6):1176–95.

46. Liang D, Bhatta S, Gerzanich V, Simard JM. Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *Neurosurg Focus*. 2007;22(5):1–9.
47. Wei L, Ying DJ, Cui L, Langsdorf J, Ping Yu S. Necrosis, apoptosis and hybrid death in the cortex and thalamus after barrel cortex ischemia in rats. *Brain Res*. 2004;1022(1–2):54–61.
48. Groom R, Oakley PA. Secondary brain injury: mechanisms and prevention. *Curr Anaesth Crit Care*. 1997;8(6):248–53.
49. Gelderblom M, Leyboldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, i sur. Temporal and Spatial Dynamics of Cerebral Immune Cell Accumulation in Stroke. *Stroke*. 2009;40(5):1849–57.
50. Stokum JA, Gerzanich V, Simard JM. Molecular pathophysiology of cerebral edema. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36(3):513–38.
51. Nawabi J, Flottmann F, Hanning U, Bechstein M, Schön G, Kemmling A, i sur. Futile Recanalization With Poor Clinical Outcome Is Associated With Increased Edema Volume After Ischemic Stroke. *Invest Radiol*. 2019;54(5):282–7.
52. Walcott BP, Miller JC, Kwon CS, Sheth SA, Hiller M, Cronin CA, i sur. Outcomes in Severe Middle Cerebral Artery Ischemic Stroke. *Neurocrit Care*. 2014;21(1):20–6.
53. Morris AWJ, Sharp MM, Albargothy NJ, Fernandes R, Hawkes CA, Verma A, i sur. Vascular basement membranes as pathways for the passage of fluid into and out of the brain. *Acta Neuropathol*. 2016;131(5):725–36.
54. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol Dis*. 2010;37(1):13–25.
55. Coomber BL, Stewart PA. Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvasc Res*. 1985;30(1):99–115.
56. Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol*. 1969;40(3):648–77.
57. Gonul E, Duz B, Kahraman S, Kayali H, Kubar A, Timurkaynak E. Early Pericyte Response to Brain Hypoxia in Cats: An Ultrastructural Study. *Microvasc Res*. 2002;64(1):116–9.
58. Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, i sur. Effects of Matrix Metalloproteinase-9 Gene Knock-Out on the Proteolysis of Blood–Brain Barrier and White Matter Components after Cerebral Ischemia. *J Neurosci*. 2001;21(19):7724–32.
59. Zhang Y, Zhang C, Zhang H, Zeng W, Li S, Chen C, i sur. ZIPK mediates endothelial cell contraction through myosin light chain phosphorylation and is required for ischemic-reperfusion injury. *The FASEB Journal*. 2019;33(8):9062–74.
60. Valable S, Montaner J, Bellail A, Berezowski V, Brillault J, Cecchelli R, i sur. VEGF-Induced BBB Permeability is Associated with an MMP-9 Activity Increase in Cerebral ischemia: Both Effects Decreased by ANG-1. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25(11):1491–504.

61. Stamatovic SM, Keep RF, Wang MM, Jankovic I, Andjelkovic A. Caveolae-mediated Internalization of Occludin and Claudin-5 during CCL2-induced Tight Junction Remodeling in Brain Endothelial Cells. *Int J Biol Chem*. 2009;284(28):19053–66.
62. Cohen SS, Min M, Cummings EE, Chen X, Sadowska GB, Sharma S, i sur. Effects of Interleukin-6 on the Expression of Tight Junction Proteins in Isolated Cerebral Microvessels from Yearling and Adult Sheep. *Neuroimmunomodulation*. 2013;20(5):264–73.
63. Rochfort KD, Collins LE, Murphy RP, Cummins PM. Downregulation of Blood-Brain Barrier Phenotype by Proinflammatory Cytokines Involves NADPH Oxidase-Dependent ROS Generation: Consequences for Interendothelial Adherens and Tight Junctions. *PLoS One* [Internet]. 2014 [pristupljeno 5.6.2022.];9(7):e101815. Dostupno na: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0101815>
64. Zhang Q, Tan J, Wan L, Chen C, Wu B, Ke X, i sur. Increase in Blood–Brain Barrier Permeability is Modulated by Tissue Kallikrein via Activation of Bradykinin B1 and B2 Receptor-Mediated Signaling. *J Inflamm Res*. 2021;14:4283–97.
65. Qiu Y, Zhang C, Chen A, Wang H, Zhou Y, Li Y, i sur. Immune Cells in the BBB Disruption After Acute Ischemic Stroke: Targets for Immune Therapy? *Front Immunol*. 2021;12:678744.
66. Perego C, Fumagalli S, de Simoni MG. Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. *J Neuroinflammation*. 2011;8(1):174.
67. Na SY, Mracsko E, Liesz A, Hünig T, Veltkamp R. Amplification of Regulatory T Cells Using a CD28 Superagonist Reduces Brain Damage After Ischemic Stroke in Mice. *Stroke*. 2015;46(1):212–20.
68. Li P, Mao L, Liu X, Gan Y, Zheng J, Thomson AW, i sur. Essential Role of Program Death 1-Ligand 1 in Regulatory T-Cell–Afforded Protection Against Blood–Brain Barrier Damage After Stroke. *Stroke*. 2014;45(3):857–64.
69. Leinonen V, Vanninen R, Rauramaa T. Raised intracranial pressure and brain edema. *Handb Clin Neurol*. 2017;145:25–37.
70. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, i sur. Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science*. 2010;330(6005):841–5.
71. Prinz M, Jung S, Priller J. Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell*. 2019;179(2):292–311.
72. Magnus T, Chan A, Savill J, Toyka K, Gold R. Phagocytotic removal of apoptotic, inflammatory lymphocytes in the central nervous system by microglia and its functional implications. *J Neuroimmunol*. 2002;130(1–2):1–9.
73. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science*. 2005;308(5726):1314–8.

74. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*. 1990;39(1):151–70.
75. Lee JE, Liang KJ, Fariss RN, Wong WT. Ex Vivo Dynamic Imaging of Retinal Microglia Using Time-Lapse Confocal Microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(9):4169–76.
76. Gülke E, Gelderblom M, Magnus T. Danger signals in stroke and their role on microglia activation after ischemia. *Ther Adv Neurol Disord*. 2018;11:175628641877425.
77. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim J v., Zuo Y, Jung S, i sur. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*. 2005;8(6):752–8.
78. Wagner N, Reinehr S, Palmhof M, Schuschel D, Tsai T, Sommer E, i sur. Microglia Activation in Retinal Ischemia Triggers Cytokine and Toll-Like Receptor Response. *J Mol Neurosci*. 2021;71(3):527–44.
79. Jiang C, Wu W, Deng Y, Ge J. Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke. *Mol Med Rep*. 2020;21(5):2006–18.
80. Asraf K, Torika N, Danon A, Fleisher-Berkovich S. Involvement of the Bradykinin B1 Receptor in Microglial Activation: In Vitro and In Vivo Studies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:82.
81. Stence N, Waite M, Dailey ME. Dynamics of microglial activation: A confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*. 2001;33(3):256–66.
82. Guruswamy R, ElAli A. Complex Roles of Microglial Cells in Ischemic Stroke Pathobiology: New Insights and Future Directions. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3):496.
83. Parakalan R, Jiang B, Nimmi B, Janani M, Jayapal M, Lu J, i sur. Transcriptome analysis of amoeboid and ramified microglia isolated from the corpus callosum of rat brain. *BMC Neurosci*. 2012;13(1):64.
84. Buscemi L, Price M, Bezzi P, Hirt L. Spatio-temporal overview of neuroinflammation in an experimental mouse stroke model. *Sci Rep*. 2019;9(1):507.
85. Zhang Z, Chopp M, Powers C. Temporal profile of microglial response following transient (2h) middle cerebral artery occlusion. *Brain Res*. 1997;744(2):189–98.
86. Sapkota A, Gaire BP, Cho KS, Jeon SJ, Kwon OW, Jang DS, i sur. Eupatilin exerts neuroprotective effects in mice with transient focal cerebral ischemia by reducing microglial activation. *PLoS One [Internet]*. 2017 [pristupljeno 10.6.2022.];12(2):e0171479. Dostuno na: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0171479>
87. Cao R, Li S, Yin J, Guo L, Shi J. Sirtuin 3 promotes microglia migration by upregulating CX3CR1. *Cell Adh Migr*. 2019;13(1):228–34.
88. Taylor RA, Sansing LH. Microglial Responses after Ischemic Stroke and Intracerebral Hemorrhage. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:1–10.
89. Liu R, Diao J, He S, Li B, Fei Y, Li Y, i sur. XQ-1H protects against ischemic stroke by regulating microglia polarization through PPAR γ pathway in mice. *Int Immunopharmacol*. 2018;57:72–81.

90. Chen J, Yin W, Tu Y, Wang S, Yang X, Chen Q, i sur. L-F001, a novel multifunctional ROCK inhibitor, suppresses neuroinflammation in vitro and in vivo: Involvement of NF- κ B inhibition and Nrf2 pathway activation. *Eur J Pharmacol.* 2017;806:1–9.
91. Cai W, Dai X, Chen J, Zhao J, Xu M, Zhang L, i sur. STAT6/Arg1 promotes microglia/macrophage efferocytosis and inflammation resolution in stroke mice. *JCI Insight* [Internet]. 2019 [pristupljeno 10.6.2022.];4(20):131355. Dostupno na: <https://insight.jci.org/articles/view/131355>
92. Qin C, Zhou LQ, Ma XT, Hu ZW, Yang S, Chen M, i sur. Dual Functions of Microglia in Ischemic Stroke. *Neurosci Bull.* 2019;35(5):921–33.
93. Yang S, Wang H, Yang Y, Wang R, Wang Y, Wu C, i sur. Baicalein administered in the subacute phase ameliorates ischemia-reperfusion-induced brain injury by reducing neuroinflammation and neuronal damage. *Biomed Pharmacother.* 2019;117:109102.
94. Meng HL, Li XX, Chen YT, Yu LJ, Zhang H, Lao JM, i sur. Neuronal Soluble Fas Ligand Drives M1-Microglia Polarization after Cerebral Ischemia. *CNS Neurosci Ther.* 2016;22(9):771–81.
95. Xiang B, Xiao C, Shen T, Li X. Anti-inflammatory effects of anisalcohol on lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia via selective modulation of microglia polarization and down-regulation of NF- κ B p65 and JNK activation. *Mol Immunol.* 2018;95:39–46.
96. Marino Lee S, Hudobenko J, McCullough LD, Chauhan A. Microglia depletion increase brain injury after acute ischemic stroke in aged mice. *Exp Neurol.* 2021;336:113530.
97. Jin WN, Shi SXY, Li Z, Li M, Wood K, Gonzales RJ, i sur. Depletion of microglia exacerbates postischemic inflammation and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(6):2224–36.
98. Szalay G, Martinecz B, Lénárt N, Környei Z, Orsolits B, Judák L, i sur. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nat Commun.* 2016;7(1):11499.
99. Otxoa-de-Amezaga A, Miró-Mur F, Pedragosa J, Gallizioli M, Justicia C, Gaja-Capdevila N, i sur. Microglial cell loss after ischemic stroke favors brain neutrophil accumulation. *Acta Neuropathol.* 2019;137(2):321–41.
100. Lalancette-Hébert M, Swarup V, Beaulieu JM, Bohacek I, Abdelhamid E, Weng YC, i sur. Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury. *J Neurosci.* 2012;32(30):10383–95.
101. Wang R, Pu H, Ye Q, Jiang M, Chen J, Zhao J, i sur. Transforming Growth Factor Beta-Activated Kinase 1–Dependent Microglial and Macrophage Responses Aggravate Long-Term Outcomes After Ischemic Stroke. *Stroke.* 2020;51(3):975–85.
102. Zhang S. Microglial activation after ischaemic stroke. *Stroke Vasc Neurol.* 2019;4(2):71–4.

103. Constanzo J, Midavaine É, Fouquet J, Lepage M, Descoteaux M, Kirby K, i sur. Brain irradiation leads to persistent neuroinflammation and long-term neurocognitive dysfunction in a region-specific manner. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2020;102:109954.
104. Jørgensen H, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS. Stroke in patients with diabetes. The Copenhagen Stroke Study. *Stroke*. 1994;25(10):1977–84.
105. Rosso C, Baronnet F, Diaz B, le Bouc R, Frasca Polara G, Moulton EJ, i sur. The silver effect of admission glucose level on excellent outcome in thrombolysed stroke patients. *J Neurol*. 2018;265(7):1684–9.
106. McColl BW, Rothwell NJ, Allan SM. Systemic Inflammatory Stimulus Potentiates the Acute Phase and CXC Chemokine Responses to Experimental Stroke and Exacerbates Brain Damage via Interleukin-1- and Neutrophil-Dependent Mechanisms. *J Neurosci*. 2007;27(16):4403–12.
107. Ma S, Wang J, Wang Y, Dai X, Xu F, Gao X, i sur. Diabetes Mellitus Impairs White Matter Repair and Long-Term Functional Deficits After Cerebral Ischemia. *Stroke*. 2018;49(10):2453–63.
108. Huynh W, Kwai N, Arnold R, Krishnan A, Lin CSY, Vucic S, i sur. The Effect of Diabetes on Cortical Function in Stroke: Implications for Poststroke Plasticity. *Diabetes*. 2017;66(6):1661–70.
109. Anderson RE, Tan WK, Martin HS, Meyer FB. Effects of Glucose and Pao₂ Modulation on Cortical Intracellular Acidosis, NADH Redox State, and Infarction in the Ischemic Penumbra. *Stroke*. 1999;30(1):160–70.
110. Duckrow RB, Beard DC, Brennan RW. Regional cerebral blood flow decreases during chronic and acute hyperglycemia. *Stroke*. 1987;18(1):52–8.
111. Li PA, Shuaib A, Miyashita H, He QP, Siesjö BK. Hyperglycemia Enhances Extracellular Glutamate Accumulation in Rats Subjected to Forebrain Ischemia. *Stroke*. 2000;31(1):183–92.
112. Araki N, Greenberg JH, Sladky JT, Uematsu D, Karp A, Reivich M. The Effect of Hyperglycemia on Intracellular Calcium in Stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1992;12(3):469–76.
113. Iwata N, Okazaki M, Nakano R, Kasahara C, Kamiuchi S, Suzuki F, i sur. Diabetes-Mediated Exacerbation of Neuronal Damage and Inflammation After Cerebral Ischemia in Rat: Protective Effects of Water-Soluble Extract from Culture Medium of *Ganoderma lucidum* Mycelia. U: *Advances in the Preclinical Study of Ischemic Stroke*. InTech; 2012. Str. 215–40.
114. Liu L, Wang Z, Wang X, Song L, Chen H, Bémeur C, i sur. Comparison of two rat models of cerebral ischemia under hyperglycemic conditions. *Microsurgery*. 2007;27(4):258–62.
115. Bémeur C, Stemarie L, Desjardins P, Vachon L, Butterworth RF, Hazell AS, i sur. Dehydroascorbic acid normalizes several markers of oxidative stress and inflammation in acute hyperglycemic focal cerebral ischemia in the rat. *Neurochem Int*. 2005;46(5):399–407.
116. Bemeur C, Stemarie L, Montgomery J. Increased oxidative stress during hyperglycemic cerebral ischemia. *Neurochem Int*. 2007;50(7–8):890–904.

117. Berger L, Hakim AM. The association of hyperglycemia with cerebral edema in stroke. *Stroke*. 1986;17(5):865–71.
118. Dietrich WD, Alonso O, Busto R. Moderate hyperglycemia worsens acute blood-brain barrier injury after forebrain ischemia in rats. *Stroke*. 1993;24(1):111–6.
119. Paciaroni M, Agnelli G, Caso V, Corea F, Ageno W, Alberti A, *i sur.* Acute Hyperglycemia and Early Hemorrhagic Transformation in Ischemic Stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2009;28(2):119–23.
120. Zhang F, Zhao Q, Jiang Y, Liu N, Liu Q, Shi FD, *i sur.* Augmented Brain Infiltration and Activation of Leukocytes After Cerebral Ischemia in Type 2 Diabetic Mice. *Front Immunol*. 2019;10:2392.
121. Lin B, Ginsberg MD, Busto R, Li L. Hyperglycemia triggers massive neutrophil deposition in brain following transient ischemia in rats. *Neurosci Lett*. 2000;278(1–2):1–4.
122. Hsieh CF, Liu CK, Lee CT, Yu LE, Wang JY. Acute glucose fluctuation impacts microglial activity, leading to inflammatory activation or self-degradation. *Sci Rep*. 2019;9(1):840.
123. Ward R, Valenzuela JP, Li W, Dong G, Fagan SC, Ergul A. Poststroke cognitive impairment and hippocampal neurovascular remodeling: the impact of diabetes and sex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* . 2018;315(5):1402–13.
124. Jackson L, Dumanli S, Johnson MH, Fagan SC, Ergul A. Microglia knockdown reduces inflammation and preserves cognition in diabetic animals after experimental stroke. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):137.
125. Gröger M, Lebesgue D, Pruneau D, Relton J, Kim SW, Nussberger J, *i sur.* Release of Bradykinin and Expression of Kinin B 2 Receptors in the Brain: Role for Cell Death and Brain Edema Formation After Focal Cerebral Ischemia in Mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25(8):978–89.
126. Gregnani MF, Hungaro TG, Martins-Silva L, Bader M, Araujo RC. Bradykinin B2 Receptor Signaling Increases Glucose Uptake and Oxidation: Evidence and Open Questions. *Front Pharmacol*. 2020;11:1162.
127. Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The Kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets. *J Pharmacol Sci*. 2005;99(1):6–38.
128. Melrose GJH, Muller HK, Vagg WJ. Correlation of Bradykinin Structure with ability to increase Vascular Permeability. *Nature*. 1970;225(5232):547–8.
129. Kaplan AP, Meier HL, Mandle RJ. The role of Hageman factor, prekallifrein, and high molecular weight kininogen in the generation of bradykinin and the initiation of coagulation and fibrinolysis. *Monogr Allergy*. 1977;12:120–30.
130. Mandle RJ, Colman RW, Kaplan AP. Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci*. 1976;73(11):4179–83.

131. Shaw JL, Diamandis EP. Distribution of 15 Human Kallikreins in Tissues and Biological Fluids. *Clin Chem*. 2007;53(8):1423–32.
132. Campbell DJ. Bradykinin Peptides. U: *Handbook of Biologically Active Peptides*. Elsevier; 2013. Str. 1386–93.
133. Cyr M, Lepage Y, Blais C, Gervais N, Cugno M, Rouleau JL, i sur. Bradykinin and des-Arg 9 -bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(1):275–83.
134. Leeb-Lundberg LMF, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the Kinin Receptor Family: from Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences. *Pharmacol Rev*. 2005;57(1):27–77.
135. Erdös EG, Skidgel RA. Metabolism of Bradykinin by Peptidases in Health and Disease. U: *The Kinin System*. Elsevier; 1997. Str. 111–41.
136. Schmaier AH. The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a multilayered interaction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285(1):1–13.
137. Georgiadis D, Beau F, Czarny B, Cotton J, Yiotakis A, Dive V. Roles of the Two Active Sites of Somatic Angiotensin-Converting Enzyme in the Cleavage of Angiotensin I and Bradykinin. *Circ Res*. 2003;93(2):148–54.
138. Kuhr F, Lowry J, Zhang Y, Brovkovich V, Skidgel RA. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides*. 2010;44(2):145–54.
139. Hachana S, Bhat M, Sénécal J, Huppé-Gourgues F, Couture R, Vaucher E. Expression, distribution and function of kinin B 1 receptor in the rat diabetic retina. *Br J Pharmacol*. 2018;175(6):968–83.
140. Sang H, Liu L, Wang L, Qiu Z, Li M, Yu L, i sur. Opposite roles of bradykinin B1 and B2 receptors during cerebral ischaemia-reperfusion injury in experimental diabetic rats. *Eur J Neurosci*. 2016;43(1):53–65.
141. Cayla C, Merino VF, Cabrini DA, Silva JA, Pesquero JB, Bader M. Structure of the mammalian kinin receptor gene locus. *Int Immunopharmacol*. 2002;2(13–14):1721–7.
142. Faussner A, Proud D, Towns M, Bathon JM. Influence of the Cytosolic Carboxyl Termini of Human B1 and B2 Kinin Receptors on Receptor Sequestration, Ligand Internalization, and Signal Transduction. *J Biol Chem*. 1998;273(5):2617–23.
143. Mathis SA, Criscimagna NL, Leeb-Lundberg LM. B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*. 1996;50(1):128–39.
144. Derian CK, Moskowitz MA. Polyphosphoinositide hydrolysis in endothelial cells and carotid artery segments. Bradykinin-2 receptor stimulation is calcium-independent. *J Biol Chem*. 1986;261(8):3831–7.

145. Nokkari A, Abou-El-Hassan H, Mechref Y, Mondello S, Kindy MS, Jaffa AA, i sur. Implication of the Kallikrein-Kinin system in neurological disorders: Quest for potential biomarkers and mechanisms. *Prog Neurobiol*. 2018;165–167:26–50.
146. Busse R, Fleming I. Regulation and Functional Consequences of Endothelial Nitric Oxide Formation. *Ann Med*. 1995;27(3):331–40.
147. Archer SL, Huang JM, Hampf V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci*. 1994;91(16):7583–7.
148. Fleming I, Fisslthaler B, Busse R. Calcium Signaling in Endothelial Cells Involves Activation of Tyrosine Kinases and Leads to Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases. *Circ Res*. 1995;76(4):522–9.
149. Ju H, Venema VJ, Liang H, Harris MB, Zou R, Venema RC. Bradykinin activates the Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/STAT signalling proteins in plasmalemmal caveolae. *Biochem J*. 2000;351(1):257.
150. Pan ZK, Zuraw BL, Lung CC, Prossnitz ER, Browning DD, Ye RD. Bradykinin stimulates NF-kappaB activation and interleukin 1beta gene expression in cultured human fibroblasts. *J Clin Invest*. 1996;98(9):2042–9.
151. Scicli AG, Forbes G, Nolly H, Dujovny M, Carretero OA. Kallikrein-Kinins in the Central Nervous System. *Clin Exp Hypertens A*. 1984;6(10–11):1731–8.
152. Couture R, Lindsey CJ. Chapter VII Brain kallikrein–kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions. U: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Elsevier; 2000. Str. 241–300.
153. Raidoo DM, Bhoola KD. Kinin receptors on human neurones. *J Neuroimmunol*. 1997;77(1):39–44.
154. Hösli E, Hösli L. Autoradiographic localization of binding sites for neuropeptide Y and bradykinin on astrocytes. *Neuroreport*. 1993;4(2):159–62.
155. Wahl M, Whalley ET, Unterberg A, Schilling L, Parsons AA, Baethmann A, i sur. Vasomotor and permeability effects of bradykinin in the cerebral microcirculation. *Immunopharmacology*. 1996;33(1–3):257–63.
156. Stephens GJ, Marriott DR, Djamgoz MBA, Wilkin GP. Electrophysiological and biochemical evidence for bradykinin receptors on cultured rat cortical oligodendrocytes. *Neurosci Lett*. 1993;153(2):223–6.
157. Noda M, Kariura Y, Amano T, Manago Y, Nishikawa K, Aoki S, i sur. Expression and function of bradykinin receptors in microglia. *Life Sci*. 2003;72(14):1573–81.
158. Ma JX, Song Q, Hatcher HC, Crouch RK, Chao L, Chao J. Expression and Cellular Localization of the Kallikrein–Kinin System in Human Ocular Tissues. *Exp Eye Res*. 1996;63(1):19–26.

159. Takeda H, Kimura Y, Higashida H, Yokoyama S. Localization of B2 bradykinin receptor mRNA in the rat retina and sclerocornea. *Immunopharmacology*. 1999;45(1–3):51–5.
160. Othman R, Berbari S, Vaucher E, Couture R. Differential Expression of Kinin Receptors in Human Wet and Dry Age-Related Macular Degeneration Retinae. *Pharmaceuticals*. 2020;13(6):130.
161. Göb E, Reymann S, Langhauser F, Schuhmann MK, Kraft P, Thielmann I, i sur. Blocking of plasma kallikrein ameliorates stroke by reducing thromboinflammation. *Ann Neurol*. 2015;77(5):784–803.
162. Kamiya T, Katayama Y, Kashiwagi F, Terashi A. The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats. *Stroke*. 1993;24(4):571–5.
163. Su J, Cui M, Tang Y, Zhou H, Liu L, Dong Q. Blockade of bradykinin B2 receptor more effectively reduces postischemic blood–brain barrier disruption and cytokines release than B1 receptor inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;388(2):205–11.
164. Austinat M, Braeuninger S, Pesquero JB, Brede M, Bader M, Stoll G, i sur. Blockade of Bradykinin Receptor B1 but Not Bradykinin Receptor B2 Provides Protection From Cerebral Infarction and Brain Edema. *Stroke*. 2009;40(1):285–93.
165. Langhauser F, Göb E, Kraft P, Geis C, Schmitt J, Brede M, i sur. Kininogen deficiency protects from ischemic neurodegeneration in mice by reducing thrombosis, blood-brain barrier damage, and inflammation. *Blood*. 2012;120(19):4082–92.
166. Gubern C, Comajoan P, Huguet G, Sánchez JM, Serena J, Kádár E, i sur. Evaluation of long-term rt-PA effects on bEnd.3 endothelial cells under ischemic conditions; changes in ZO-1 expression and glycosylation of the bradykinin B2 receptor. *Thromb Res*. 2020;187:1–8.
167. Dobrivojević M, Špiranec K, Sindić A. Involvement of bradykinin in brain edema development after ischemic stroke. *Pflugers Arch*. 2015;467(2):201–12.
168. Kunz M, Nussberger J, Holtmannspötter M, Bitterling H, Plesnila N, Zausinger S. Bradykinin in Blood and Cerebrospinal Fluid after Acute Cerebral Lesions: Correlations with Cerebral Edema and Intracranial Pressure. *J Neurotrauma*. 2013;30(19):1638–44.
169. Xia CF, Smith RS, Shen B, Yang ZR, Borlongan C, Chao L, i sur. Postischemic Brain Injury Is Exacerbated in Mice Lacking the Kinin B2 Receptor. *Hypertension*. 2006;47(4):752–61.
170. Dobrivojević M, Špiranec K, Gorup D, Erjavec I, Habek N, Radmilović M, i sur. Urodilatin reverses the detrimental influence of bradykinin in acute ischemic stroke. *Exp Neurol*. 2016;284:1–10.
171. Zausinger S, Lumenta DB, Pruneau D, Schmid-Elsaesser R, Plesnila N, Baethmann A. Effects of LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, on brain edema formation and tissue damage in a rat model of temporary focal cerebral ischemia. *Brain Res*. 2002;950(1–2):268–78.

172. Ding-Zhou L, Margaille I, Palmier B, Pruneau D, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C. LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces ischemic brain injury in a murine model of transient focal cerebral ischemia. *Br J Pharmacol.* 2003;139(8):1539–47.
173. Kläsner B, Lumenta DB, Pruneau D, Zausinger S, Plesnila N. Therapeutic window of bradykinin B2 receptor inhibition after focal cerebral ischemia in rats. *Neurochem Int.* 2006;49(5):442–7.
174. Ping A, Chun ZX, Xue XY. Bradykinin preconditioning induces protective effects against focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2005;1059(2):105–12.
175. Abdouh M, Khanjari A, Abdelazziz N, Ongali B, Couture R, Hasséssian HM. Early upregulation of kinin B1 receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat. *Br J Pharmacol.* 2003;140(1):33–40.
176. Abdouh M, Talbot S, Couture R, Hasséssian HM. Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B(1) and B(2) receptors. *Br J Pharmacol.* 2008;154(1):136–43.
177. Masuda T, Shimazawa M, Ishizuka F, Nakamura S, Tsuruma K, Hara H. Tissue kallikrein (kallidinogenase) protects against retinal ischemic damage in mice. *Eur J Pharmacol.* 2014;738:74–82.
178. Yasuyoshi H, Kashii S, Zhang S, Nishida A, Yamauchi T, Honda Y, i sur. Protective effect of bradykinin against glutamate neurotoxicity in cultured rat retinal neurons. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(8):2273–8.
179. Fukuda K, Hirooka K, Mizote M, Nakamura T, Itano T, Shiraga F. Neuroprotection against Retinal Ischemia–Reperfusion Injury by Blocking the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(7):3629.
180. Huisman C, Kok P, Schmaal L, Verhoog P. Bradykinin: A Microglia Attractant In Vivo? *J Neurosci.* 2008;28(14):3531–2.
181. Jaffa AA, Jaffa MA, Moussa M, Ahmed IA, Karam M, Aldeen KS, i sur. Modulation of Neuro-Inflammatory Signals in Microglia by Plasma Prekallikrein and Neuronal Cell Debris. *Front Pharmacol.* 2021;12:743059.
182. Noda M, Sasaki K, Ifuku M, Wada K. Multifunctional effects of bradykinin on glial cells in relation to potential anti-inflammatory effects. *Neurochem Int.* 2007;51(2–4):185–91.
183. Tang M, Liu P, Li X, Wang J, Zhu X, He F. Protective action of B1R antagonist against cerebral ischemia-reperfusion injury through suppressing miR-200c expression of Microglia-derived microvesicles. *Neurol Res.* 2017;39(7):612–20.
184. Ifuku M, Farber K, Okuno Y, Yamakawa Y, Miyamoto T, Nolte C, i sur. Bradykinin-Induced Microglial Migration Mediated by B1-Bradykinin Receptors Depends on Ca²⁺ Influx via Reverse-Mode Activity of the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger. *J Neurosci.* 2007;27(48):13065–73.
185. Wasinski F, Batista RO, Bader M, Araujo RC, Klempin F. Bradykinin B2 receptor is essential to running-induced cell proliferation in the adult mouse hippocampus. *Brain Struct Funct.* 2018;223(8):3901–7.

186. Sharma JN, Al-Shoumer KAS, Matar KM, Al-Gharee HY, Madathil NV. Bradykinin-Forming Components in Kuwaiti Patients with Type 2 Diabetes. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013;26(3):699–705.
187. Gabra BH, Sirois P. Role of bradykinin B1 receptors in diabetes-induced hyperalgesia in streptozotocin-treated mice. *Eur J Pharmacol*. 2002;457(2–3):115–24.
188. Phipps JA, Feener EP. The kallikrein–kinin system in diabetic retinopathy: Lessons for the kidney. *Kidney Int*. 2008;73(10):1114–9.
189. Federspil G, Vettor R, de Palo E, Padovan D, Siculo N, Scandellari C. Plasma kallikrein activity in human diabetes mellitus. *Metabolism*. 1983;32(6):540–2.
190. Campbell DJ, Kladis A, Zhang Y, Jenkins AJ, Prior DL, Yii M, i sur. Increased tissue kallikrein levels in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2010;53(4):779–85.
191. Peddinti G, Cobb J, Yengo L, Froguel P, Kravić J, Balkau B, i sur. Early metabolic markers identify potential targets for the prevention of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(9):1740–50.
192. Clermont A, Chilcote TJ, Kita T, Liu J, Riva P, Sinha S, i sur. Plasma kallikrein mediates retinal vascular dysfunction and induces retinal thickening in diabetic rats. *Diabetes*. 2011;60(5):1590–8.
193. Campbell DJ, Kelly DJ, Wilkinson-Berka JL, Cooper ME, Skinner SL. Increased bradykinin and “normal” angiotensin peptide levels in diabetic Sprague-Dawley and transgenic (mRen-2)27 rats. *Kidney Int*. 1999;56(1):211–21.
194. Christopher J, Jaffa AA. Diabetes modulates the expression of glomerular kinin receptors. *Int Immunopharmacol*. 2002;2(13–14):1771–9.
195. Tan Y, Wang B, Keum JS, Jaffa AA. Mechanisms through which bradykinin promotes glomerular injury in diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288(3):483–92.
196. Yerneni KK, Bai W, Khan B, Medford RM, Natarajan R. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*. 1999;48(4):855–64.
197. Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev*. 1998;14(2):129–51.
198. Pouliot M, Talbot S, Sénécal J, Dotigny F, Vaucher E, Couture R. Ocular application of the kinin B1 receptor antagonist LF22-0542 inhibits retinal inflammation and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. *PLoS One* [Internet]. 2012 [pristupljeno 15.6.2022.];7(3):e33864. Dostupno na: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0033864>
199. Catanzaro O, Labal E, Andornino A, Capponi JA, di Martino I, Sirois P. Blockade of early and late retinal biochemical alterations associated with diabetes development by the selective bradykinin B1 receptor antagonist R-954. *Peptides (NY)*. 2012;34(2):349–52.
200. Zuccollo A, Navarro M, Catanzaro O. Effects of B1 and B2 kinin receptor antagonists in diabetic mice. *Can J Physiol Pharmacol*. 1996;74(5):586–9.

201. Zuccollo A, Navarro M, Frontera M, Cueva F, Carattino M, Catanzaro OL. The involvement of kallikrein-kinin system in diabetes type I (insulinitis). *Immunopharmacology*. 1999;45(1-3):69-74.
202. Henriksen EJ, Jacob S. Effects of captopril on glucose transport activity in skeletal muscle of obese Zucker rats. *Metabolism*. 1995;44(2):267-72.
203. Yang C, Lee B, Chen TH, Hsu WH. Mechanisms of bradykinin-induced insulin secretion in clonal beta cell line RINm5F. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;282(3):1247-52.
204. Sang H, Qiu Z, Cai J, Lan W, Yu L, Zhang H, i sur. Early Increased Bradykinin 1 Receptor Contributes to Hemorrhagic Transformation After Ischemic Stroke in Type 1 Diabetic Rats. *Transl Stroke Res*. 2017;8(6):597-611.
205. Shi R, Yuan K, Hu B, Sang H, Zhou L, Xie Y, i sur. Tissue Kallikrein Alleviates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Activating the B2R-ERK1/2-CREB-Bcl-2 Signaling Pathway in Diabetic Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1-14.
206. Campos MM, Cabrini DA, Cardozo AHM, Alexander Rae G, Huidobro Toro JP, Calixto JB. Changes in paw oedema triggered via bradykinin B1 and B2 receptors in streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2001;416(1-2):169-77.
207. Yoshinaga T, Nakatome K, Nozaki JI, Naitoh M, Hoseki J, Kubota H, i sur. Proinsulin lacking the A7-B7 disulfide bond, Ins2Akita, tends to aggregate due to the exposed hydrophobic surface. *Biol Chem*. 2005;386(11):1077-85.
208. Yoshioka M, Kayo T, Ikeda T, Koizumi A. A Novel Locus, Mody4 , Distal to D7Mit189 on Chromosome 7 Determines Early-Onset NIDDM in Nonobese C57BL/6 (Akita) Mutant Mice. *Diabetes*. 1997;46(5):887-94.
209. Kakoki M, Takahashi N, Jennette JC, Smithies O. Diabetic nephropathy is markedly enhanced in mice lacking the bradykinin B2 receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(36):13302-5.
210. Borkowski JA, Ransom RW, Seabrook GR, Trumbauer M, Chen H, Hill RG, i sur. Targeted disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *J Biol Chem*. 1995;270(23):13706-10.
211. Undi R, Lim HY, Wang W. Rapid and reliable identification of insulin 2 gene mutation in Akita diabetic mice by a tetra-primer-ARMS-PCR method. *Heliyon* [Internet]. 2019 [pristupljeno 20.6.2022.];5(1):e01112. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844018351247>
212. Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Chen S, Lian J. Brain microvessels: factors altering their patency after the occlusion of a middle cerebral artery (Wistar rat). *Am J Pathol*. 1994;145(3):728-40.
213. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20(1):84-91.
214. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, i sur. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-82.

215. Lalancette-Hebert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. Selective Ablation of Proliferating Microglial Cells Exacerbates Ischemic Injury in the Brain. *J Neurosci*. 2007;27(10):2596–605.
216. York EM, LeDue JM, Bernier LP, MacVicar BA. 3DMorph Automatic Analysis of Microglial Morphology in Three Dimensions from Ex Vivo and In Vivo Imaging. *eNeuro* [Internet]. 2018 [pristupljeno 22.5.2022.];5(6):ENEURO.0266-18.2018. Dostupno na: <https://www.eneuro.org/lookup/doi/10.1523/ENEURO.0266-18.2018>
217. Kakoki M, Sullivan KA, Backus C, Hayes JM, Oh SS, Hua K, i sur. Lack of both bradykinin B1 and B2 receptors enhances nephropathy, neuropathy, and bone mineral loss in Akita diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(22):10190–5.
218. Zhou Y, Xiao H, Wu J, Zha L, Zhou M, Li Q, i sur. Type I Diabetic Akita Mouse Model is Characterized by Abnormal Cardiac Deformation During Early Stages of Diabetic Cardiomyopathy with Speckle-Tracking Based Strain Imaging. *Cell Physiol Biochem*. 2018;45(4):1541–50.
219. Park M, Nishimura T, Baeza-Garza CD, Caldwell ST, Pun PBL, Prag HA, i sur. Confirmation of the Cardioprotective Effect of MitoGamide in the Diabetic Heart. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2020;34(6):823–34.
220. Toque HA, Nunes KP, Yao L, Xu Z, Kondrikov D, Su Y, i sur. Akita Spontaneously Type 1 Diabetic Mice Exhibit Elevated Vascular Arginase and Impaired Vascular Endothelial and Nitric Function. *PLoS One* [Internet]. 2013 [pristupljeno 1.7.2022.];8(8):e72277. Dostupno na: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0072277>
221. Butkowski EG, Jelinek HF. Hyperglycaemia, oxidative stress and inflammatory markers. *Redox Rep*. 2017;22(6):257–64.
222. Rosenfalck AM, Almdal T, Hilsted J, Madsbad S. Body composition in adults with Type 1 diabetes at onset and during the first year of insulin therapy. *Diabet Med*. 2002;19(5):417–23.
223. de Picoli Souza K, Batista EC, Silva ED, Reis FC, Silva SMA, Araujo RC, i sur. Effect of kinin B2 receptor ablation on skeletal muscle development and myostatin gene expression. *Neuropeptides*. 2010;44(2):209–14.
224. Cheung BMY, Li C. Diabetes and Hypertension: Is There a Common Metabolic Pathway? *Curr Atheroscler Rep*. 2012;14(2):160–6.
225. Alfie ME, Yang XP, Hess F, Carretero OA. Salt-Sensitive Hypertension in Bradykinin B2 Receptor Knockout Mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;224(3):625–30.
226. McManus M, Liebeskind DS. Blood Pressure in Acute Ischemic Stroke. *J Clin Neurol*. 2016;12(2):137–46.
227. Savinova O, Sugiyama F, Martin JE, Tomarev SI, Paigen BJ, Smith RS, i sur. Intraocular pressure in genetically distinct mice: an update and strain survey. *BMC Genet*. 2001;2(1):12.

228. Hymowitz MB, Chang D, Feinberg EB, Roy S. Increased Intraocular Pressure and Hyperglycemic Level in Diabetic Patients. *PLoS One* [Internet]. 2016 [pristupljeno 1.7.2022.];11(3):e0151833. Dostupno na: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0151833>
229. Homme RP, Sandhu HS, George AK, Tyagi SC, Singh M. Sustained Inhibition of NF- κ B Activity Mitigates Retinal Vasculopathy in Diabetes. *Am J Pathol*. 2021;191(5):947–64.
230. Green K, Elijah D. Drug effects on aqueous humor formation and pseudofacility in normal rabbit eyes. *Exp Eye Res*. 1981;33(3):239–45.
231. Terzuoli E, Meini S, Cucchi P, Catalani C, Cialdai C, Maggi CA, i sur. Antagonism of Bradykinin B2 Receptor Prevents Inflammatory Responses in Human Endothelial Cells by Quenching the NF- κ B Pathway Activation. *PLoS One* [Internet]. 2014 [pristupljeno 1.7.2022.];9(1):e84358. Dostupno na: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0084358>
232. Justić H, Barić A, Šimunić I, Radmilović M, Ister R, Škokić S, i sur. Redefining the Koizumi model of mouse cerebral ischemia: A comparative longitudinal study of cerebral and retinal ischemia in the Koizumi and Longa middle cerebral artery occlusion models. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2022;42(11):2080-2094.
233. Kalani A, Kamat PK, Tyagi N. Diabetic Stroke Severity: Epigenetic Remodeling and Neuronal, Glial, and Vascular Dysfunction. *Diabetes*. 2015;64(12):4260–71.
234. Yan M, Li M, Gu S, Sun Z, Ma T, Ma X. Ginkgo biloba extract protects diabetic rats against cerebral ischemia reperfusion injury by suppressing oxidative stress and upregulating the expression of glutamate transporter 1. *Mol Med Rep* [Internet]. 2020 [pristupljeno 4.7.2022.];21(4):1809–18. Dostupno na: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2020.10990>
235. He CF, Xue WJ, Xu XD, Wang JT, Wang XR, Feng Y, i sur. Knockdown of NRSF Alleviates Ischemic Brain Injury and Microvasculature Defects in Diabetic MCAO Mice. *Front Neurol* [Internet]. 2022 [pristupljeno 4.7.2022.];13:869220. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2022.869220/full>
236. McColl BW, Carswell H, McCulloch J, Horsburgh K. Extension of cerebral hypoperfusion and ischaemic pathology beyond MCA territory after intraluminal filament occlusion in C57Bl/6J mice. *Brain Res*. 2004;997(1):15–23.
237. Wehrl HF, Bezrukov I, Wiehr S, Lehnhoff M, Fuchs K, Mannheim JG, i sur. Assessment of murine brain tissue shrinkage caused by different histological fixatives using magnetic resonance and computed tomography imaging. *Histol Histopathol*. 2015;30(5):601–13.
238. Yuen NY, Chechneva O, Chen YJ, Tsai YC, Little LK, Dang J, i sur. Exacerbated brain edema in a rat streptozotocin model of hyperglycemic ischemic stroke: Evidence for involvement of blood–brain barrier Na–K–Cl cotransport and Na/H exchange. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2019;39(9):1678–92.
239. Sarker MH, Hu D -E, Fraser PA. Acute effects of bradykinin on cerebral microvascular permeability in the anaesthetized rat. *J Physiol*. 2000;528(1):177–87.

240. Sikpa D, Whittingstall L, Savard M, Lebel R, Côté J, McManus S, i sur. Pharmacological Modulation of Blood–Brain Barrier Permeability by Kinin Analogs in Normal and Pathologic Conditions. *Pharmaceuticals*. 2020;13(10):279.
241. Sebastiani A, Hirnet T, Jahn-Eimermacher A, Thal SC. Comparison of speed-vacuum method and heat-drying method to measure brain water content of small brain samples. *J Neurosci Methods*. 2017;276:73–8.
242. Haley MJ, White CS, Roberts D, O’Toole K, Cunningham CJ, Rivers-Auty J, i sur. Stroke Induces Prolonged Changes in Lipid Metabolism, the Liver and Body Composition in Mice. *Transl Stroke Res*. 2020;11(4):837–50.
243. Cai L, Geng X, Hussain M, Liu Z, Gao Z, Liu S, i sur. Weight loss: indication of brain damage and effect of combined normobaric oxygen and ethanol therapy after stroke. *Neurol Res*. 2015;37(5):441–6.
244. Lu J, Zhang Y, Shi J. Effects of intracerebroventricular infusion of angiotensin-(1–7) on bradykinin formation and the kinin receptor expression after focal cerebral ischemia–reperfusion in rats. *Brain Res*. 2008;1219:127–35.
245. Desposito D, Zadigue G, Taveau C, Adam C, Alhenc-Gelas F, Bouby N, i sur. Neuroprotective effect of kinin B1 receptor activation in acute cerebral ischemia in diabetic mice. *Sci Rep*. 2017;7(1):9410.
246. Wu M, Ai W, Chen L, Zhao S, Liu E. Bradykinin receptors and EphB2/EphrinB2 pathway in response to high glucose-induced osteoblast dysfunction and hyperglycemia-induced bone deterioration in mice. *Int J Mol Med*. 2016;37(3):565–74.
247. Duka I, Kintsurashvili E, Gavras I, Johns C, Bresnahan M, Gavras H. Vasoactive Potential of the B 1 Bradykinin Receptor in Normotension and Hypertension. *Circ Res*. 2001;88(3):275–81.
248. Perl K, Ushakov K, Pozniak Y, Yizhar-Barnea O, Bhonker Y, Shivatzki S, i sur. Reduced changes in protein compared to mRNA levels across non-proliferating tissues. *BMC Genomics*. 2017;18(1):305.
249. Zanier ER, Fumagalli S, Perego C, Pischiotta F, de Simoni MG. Shape descriptors of the “never resting” microglia in three different acute brain injury models in mice. *Intensive Care Med Exp*. 2015;3(1):7.
250. Bohacek I, Cordeau P, Lalancette–Hébert M, Gorup D, Weng YC, Gajovic S, i sur. Toll-like receptor 2 deficiency leads to delayed exacerbation of ischemic injury. *J Neuroinflammation*. 2012;9(1):682.
251. Okar S, Topcuoglu MA, Yemisci M, Cakir Aktas C, Oguz KK, Arsava EM. Post-stroke inflammatory response is linked to volume loss in the contralateral hemisphere. *J Neuroimmunol*. 2020;344:577247.
252. Lagrèze HL, Levine RL, Pedula KL, Nickles RJ, Sunderland JS, Rowe BR. Contralateral flow reduction in unilateral stroke: evidence for transhemispheric diaschisis. *Stroke*. 1987;18(5):882–6.

253. Lorberboym M, Blankenberg FG, Sadeh M, Lampl Y. In vivo imaging of apoptosis in patients with acute stroke: correlation with blood-brain barrier permeability. *Brain Res.* 2006;1103(1):13–9.
254. Jiang X, Andjelkovic A, Zhu L, Yang T, Bennett MVL, Chen J, i sur. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. *Prog Neurobiol.* 2018;163–164:144–71.
255. Garbuzova-Davis S, Rodrigues MCO, Hernandez-Ontiveros DG, Tajiri N, Frisina-Deyo A, Boffeli SM, i sur. Blood-brain barrier alterations provide evidence of subacute diaschisis in an ischemic stroke rat model. *PLoS One* [Internet]. 2013 [pristupljeno 11.7.2022.];8(5):e63553. Dostupno na: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0063553>
256. Ruan L, Wang Y, Chen SC, Zhao T, Huang Q, Hu ZL, i sur. Metabolite changes in the ipsilateral and contralateral cerebral hemispheres in rats with middle cerebral artery occlusion. *Neural Regen Res.* 2017;12(6):931–7.
257. Kumari R, Willing LB, Krady JK, Vannucci SJ, Simpson IA. Impaired wound healing after cerebral hypoxia-ischemia in the diabetic mouse. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27(4):710–8.
258. Zhang L, Nair A, Krady K, Corpe C, Bonneau RH, Simpson IA, i sur. Estrogen stimulates microglia and brain recovery from hypoxia-ischemia in normoglycemic but not diabetic female mice. *J Clin Invest.* 2004;113(1):85–95.
259. Gao H, Ju F, Ti R, Zhang Y, Zhang S. Differential Regulation of Microglial Activation in Response to Different Degree of Ischemia. *Front Immunol.* 2022;13:792638.
260. Jayaraj RL, Azimullah S, Beiram R, Jalal FY, Rosenberg GA. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):142.
261. Gaillard T, Miller E. Guidelines for Stroke Survivors With Diabetes Mellitus. *Stroke.* 2018;49(6):215–7.
262. Unger MS, Scherthner P, Marschallinger J, Mrowetz H, Aigner L. Microglia prevent peripheral immune cell invasion and promote an anti-inflammatory environment in the brain of APP-PS1 transgenic mice. *J Neuroinflammation.* 2018;15(1):274.
263. Reeson P, Jeffery A, Brown CE. Illuminating the Effects of Stroke on the Diabetic Brain: Insights From Imaging Neural and Vascular Networks in Experimental Animal Models. *Diabetes.* 2016;65(7):1779–88.
264. Chiang WC, Chen YM, Lin SL, Wu KD, Tsai TJ. Bradykinin enhances reactive oxygen species generation, mitochondrial injury, and cell death induced by ATP depletion--a role of the phospholipase C-Ca(2+) pathway. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(5):702–10.
265. Barić A, Dobrivojević Radmilović M. Microglia and bradykinin cross talk in poststroke cognitive impairment in diabetes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2021;320(4):613–8.
266. Niizuma K, Yoshioka H, Chen H, Kim GS, Jung JE, Katsu M, i sur. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(1):92–9.

267. Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res.* 2003;93(4):292–301.
268. Tsujimoto Y, Shimizu S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis.* 2007;12(5):835–40.
269. Hengartner MO. Apoptosis. Death cycle and Swiss army knives. *Nature.* 1998;391(6666):441–2.
270. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* 1992;258(5082):607–14.
271. Marsh KA, Hill SJ. Characteristics of the bradykinin-induced changes in intracellular calcium ion concentration of single bovine tracheal smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 1993;110(1):29–35.
272. Morrison HW, Filosa JA. Stroke and the neurovascular unit: glial cells, sex differences, and hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2019;316(3):C325–39.
273. Franco R, Fernández-Suárez D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 2015;131:65–86.
274. Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, i sur. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2012;43(11):3063–70.
275. Stratoulas V, Venero JL, Tremblay MÈ, Joseph B. Microglial subtypes: diversity within the microglial community. *EMBO J [Internet].* 2019 [pristupljeno 10.7.2022.];38(17):e101997. Dostupno na: <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/embj.2019101997>
276. Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, Böttcher C, Amann L, Sagar, i sur. Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature.* 2019;566(7744):388–92.
277. Hammond TR, Dufort C, Dissing-Olesen L, Giera S, Young A, Wysoker A, i sur. Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity.* 2019;50(1):253–271.e6.
278. Zheng K, Lin L, Jiang W, Chen L, Zhang X, Zhang Q, i sur. Single-cell RNA-seq reveals the transcriptional landscape in ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2022;42(1):56–73.
279. Jonas RA, Yuan TF, Liang YX, Jonas JB, Tay DKC, Ellis-Behnke RG. The spider effect: morphological and orienting classification of microglia in response to stimuli in vivo. *PLoS One [Internet].* 2012 [pristupljeno 12.7.2022.];7(2):e30763. Dostupno na: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0030763>
280. Fumagalli M, Lombardi M, Gressens P, Verderio C. How to reprogram microglia toward beneficial functions. *Glia.* 2018;66(12):2531–49.
281. Ransohoff RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature.* 2010;468(7321):253–62.

282. Herz J, Filiano AJ, Smith A, Yogev N, Kipnis J. Myeloid Cells in the Central Nervous System. *Immunity*. 2017;46(6):943–56.
283. Yew WP, Djukic ND, Jayaseelan JSP, Walker FR, Roos KAA, Chataway TK, i sur. Early treatment with minocycline following stroke in rats improves functional recovery and differentially modifies responses of peri-infarct microglia and astrocytes. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):6.
284. Noda M, Kariura Y, Pannasch U, Nishikawa K, Wang L, Seike T, i sur. Neuroprotective role of bradykinin because of the attenuation of pro-inflammatory cytokine release from activated microglia. *J Neurochem*. 2007;101(2):397–410.
285. Sarit BS, Lajos G, Abraham D, Ron A, Sigal FB. Inhibitory role of kinins on microglial nitric oxide and tumor necrosis factor- α production. *Peptides (NY)*. 2012;35(2):172–81.
286. Levant A, Levy E, Argaman M, Fleisher-Berkovich S. Kinins and neuroinflammation: dual effect on prostaglandin synthesis. *Eur J Pharmacol*. 2006;546(1–3):197–200.
287. Lee H, Kim HK, Shin HS, Han SJ, Yoon S, Seong JK, i sur. Evaluation of factors related to Anaesthesia-induced Lens opacity in experimental mice. *Lab Anim Res*. 2020;36:1.
288. Li XT, Qin Y, Zhao JY, Zhang JS. Acute lens opacity induced by different kinds of anesthetic drugs in mice. *Int J Ophthalmol*. 2019;12(6):904–8.
289. Bermudez MA, Vicente AF, Romero MC, Arcos MD, Abalo JM, Gonzalez F. Time course of cold cataract development in anesthetized mice. *Curr Eye Res*. 2011;36(3):278–84.
290. Park JH. Transient bilateral cataract during intensive glucose control: a case report. *J Med Case Rep*. 2017;11(1):107.
291. Jedziniak JA, Chylack LT, Cheng HM, Gillis MK, Kalustian AA, Tung WH. The sorbitol pathway in the human lens: aldose reductase and polyol dehydrogenase. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981;20(3):314–26.
292. Lee JP, Olver JM. Anterior Segment Ischaemia. *Eye*. 1990;4(1):1–6.
293. McLeod D. Letter to the editor: partial central retinal artery occlusion offers a unique insight into the ischemic penumbra. *Clin Ophthalmol*. 2012;6:9–22.
294. Ebnetter A. Protection of Retinal Ganglion Cells and the Optic Nerve During Short-term Hyperglycemia in Experimental Glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 2011;129(10):1337.
295. Cunha-Vaz J, Santos T, Alves D, Marques I, Neves C, Soares M, i sur. Agreement between OCT Leakage and Fluorescein Angiography to Identify Sites of Alteration of the Blood–Retinal Barrier in Diabetes. *Ophthalmol Retina*. 2017;1(5):395–403.
296. Barber AJ, Antonetti DA, Kern TS, Reiter CEN, Soans RS, Krady JK, i sur. The Ins2 Akita Mouse as a Model of Early Retinal Complications in Diabetes. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(6):2210.
297. Kita T, Clermont AC, Murugesan N, Zhou Q, Fujisawa K, Ishibashi T, i sur. Plasma Kallikrein-Kinin System as a VEGF-Independent Mediator of Diabetic Macular Edema. *Diabetes*. 2015;64(10):3588–99.

298. Othman R, Vaucher E, Couture R. Bradykinin Type 1 Receptor – Inducible Nitric Oxide Synthase: A New Axis Implicated in Diabetic Retinopathy. *Front Pharmacol.* 2019;10:300.
299. Liu J, Feener EP. Plasma kallikrein-kinin system and diabetic retinopathy. *Biol Chem.* 2013;394(3):319–28.
300. Palmhof M, Frank V, Rappard P, Kortenhorn E, Demuth J, Biert N, i sur. From Ganglion Cell to Photoreceptor Layer: Timeline of Deterioration in a Rat Ischemia/Reperfusion Model. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:174.
301. Lucas-Ruiz F, Galindo-Romero C, Albaladejo-García V, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Mechanisms implicated in the contralateral effect in the central nervous system after unilateral injury: focus on the visual system. *Neural Regen Res.* 2021;16(11):2125.
302. Batchelor PE, Porritt MJ, Martinello P, Parish CL, Liberatore GT, Donnan GA, et al. Macrophages and Microglia Produce Local Trophic Gradients That Stimulate Axonal Sprouting Toward but Not beyond the Wound Edge. *Mol Cell Neurosci.* 2002;21(3):436–53.
303. Zhang C, Lam TT, Tso MO. Heterogeneous populations of microglia/macrophages in the retina and their activation after retinal ischemia and reperfusion injury. *Exp Eye Res.* 2005;81(6):700–9.
304. Krady JK, Basu A, Allen CM, Xu Y, LaNoue KF, Gardner TW, i sur. Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy. *Diabetes.* 2005;54(5):1559–65.
305. Halder SK, Matsunaga H, Ishii KJ, Akira S, Miyake K, Ueda H. Retinal cell type-specific prevention of ischemia-induced damages by LPS-TLR4 signaling through microglia. *J Neurochem.* 2013;126(2):243–60.
306. Rojas B, Gallego BI, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Valiente-Soriano FJ, i sur. Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers. *J Neuroinflammation.* 2014;11(1):133.
307. O’Koren EG, Mathew R, Saban DR. Fate mapping reveals that microglia and recruited monocyte-derived macrophages are definitively distinguishable by phenotype in the retina. *Sci Rep.* 2016;6(1):20636.
308. Eter N, Engel DR, Meyer L, Helb HM, Roth F, Maurer J, i sur. In vivo visualization of dendritic cells, macrophages, and microglial cells responding to laser-induced damage in the fundus of the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(8):3649–58.
309. Guo L, Choi S, Bikkannavar P, Cordeiro MF. Microglia: Key Players in Retinal Ageing and Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci.* 2022;16:804782.
310. Holloway OG, Canty AJ, King AE, Ziebell JM. Rod microglia and their role in neurological diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2019;94:96–103.
311. Wang K, Peng B, Lin B. Fractalkine receptor regulates microglial neurotoxicity in an experimental mouse glaucoma model. *Glia.* 2014;62(12):1943–54.
312. Karlstetter M, Scholz R, Rutar M, Wong WT, Provis JM, Langmann T. Retinal microglia: just bystander or target for therapy? *Prog Retin Eye Res.* 2015;45:30–57.

313. Rangasamy S, McGuire PG, Franco Nitta C, Monickaraj F, Oruganti SR, Das A. Chemokine mediated monocyte trafficking into the retina: role of inflammation in alteration of the blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. *PLoS One* [Internet]. 2014 [pristupljeno 14.7.2022.];9(10):e108508. Dostupno na: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0108508>
314. Li X, Yu ZW, Li HY, Yuan Y, Gao XY, Kuang HY. Retinal microglia polarization in diabetic retinopathy. *Vis Neurosci*. 2021;38:E006.
315. Yun JH. Interleukin-1 β induces pericyte apoptosis via the NF- κ B pathway in diabetic retinopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;546:46–53.
316. Xie H, Zhang C, Liu D, Yang Q, Tang L, Wang T, i sur. Erythropoietin protects the inner blood-retinal barrier by inhibiting microglia phagocytosis via Src/Akt/cofilin signalling in experimental diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 2021;64(1):211–25.
317. Madeira MH, Boia R, Santos PF, Ambrósio AF, Santiago AR. Contribution of Microglia-Mediated Neuroinflammation to Retinal Degenerative Diseases. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:1–15.

11. BIOGRAFIJA

Anja Barić rođena je 24. rujna 1993. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu školu i prirodoslovno-matematičku gimnaziju. Diplomirala je 2018. godine na studiju Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomskim radom pod naslovom: "Povezanost polimorfizma gena za katehol-O-metil transferazu s odgovorom na terapiju antipsihoticima u pacijenata sa shizofrenijom". Iste godine upisala je poslijediplomski sveučilišni doktorski studij Neuroznanost na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te je u okviru programa „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ Hrvatske zaklade za znanost financiranog iz sredstava Europske unije zaposlena kao suradnik / asistent na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Kao znanstveni novak sudjelovala je u projektu „Uloga bradikinina u ishemiji mozga i mrežnice u mišjim modelima dijabetesa“ Hrvatske zaklade za znanost pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Marine Radmilović. Autorica je dva znanstvena rada indeksirana u prvoj kvartili, koautorica jednog rada indeksiranog u drugoj kvartili, 8 sažetaka na međunarodnim i 2 sažetka na domaćim kongresima te dobitnica međunarodne nagrade za najbolji poster u kategoriji „Disease models in neuroimaging“. Od 2019. godine sudjeluje u nastavi iz predmeta „Histologija i embriologija“ na preddiplomskom studiju medicine Medicinskog fakulteta u Zagrebu te istog predmeta na engleskome jeziku.