

# Uloga receptora TLR2 u odgovoru mozga nakon ishemijskoga oštećenja

---

**Bohaček, Ivan**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2012**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:173466>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-14**



*Repository / Repozitorij:*

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





## **Središnja medicinska knjižnica**

**Bohaček, Ivan (2012) *Uloga receptora TLR2 u odgovoru mozga nakon ishemijskoga oštećenja*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/1805>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivan Bohaček**

**Uloga receptora TLR2 u odgovoru  
mozga nakon ishemijskoga oštećenja**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2012.

Disertacija je izrađena na Sveučilištu u Zagrebu, Medicinskom fakultetu, Hrvatskom institutu za istraživanje mozga u Laboratoriju za neurogenetiku i razvojnu genetiku, te na Sveučilištu Laval, Medicinskom fakultetu, Istraživačkom centru Kliničkog bolničkog centra Sveučilišta Laval, u Laboratoriju Zavoda za psihijatriju i neuroznanost, Quebec City, Kanada.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Srećko Gajović

Suvoditelj rada: prof. dr. sc. Jasna Križ

*Zahvaljujem svojim mentorima, prof. dr. sc. Srećku Gajoviću i prof. dr. sc. Jasni Križ na nesebičnoj pomoći, brojnim pozitivnim savjetima i konstruktivnim kritikama koje sam primio tijekom izrade ovoga rada. Zahvaljujući njima stekao sam široke spoznaje o svijetu znanosti koje su mi otvorile vidike i pokazale mi kako u znanosti granica nema.*

*Zahvaljujem svojim roditeljima, bratu i sestri na pruženoj ljubavi, podršci i strpljenju. Obiteljski dom tijekom cijelog mog školovanja čvrsto me usmjeravao i podupirao u svim mojim naporima, istovremeno pružajući nezamjenjivi osjećaj topline i sigurnosti.*

*Više od svega, zahvalnost dugujem svojoj obitelji: supruzi Ana-Mariji te sinu Jakovu koji su mi pružili nemjerljivu podršku i ljubav, a bez čijeg odricanja ovaj rad nikada ne bi bio dovršen. Volim Vas!*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Moždani udar i ishemijska ozljeda mozga.....	1
1.2. Patofiziološka kaskada događaja u ishemijskom oštećenju mozga .....	2
1.3. Uloga upale u patofiziologiji ishemijskoga oštećenja mozga.....	9
1.3.1. Uloga rezidentnih stanica u patofiziologiji ishemijskoga oštećenja mozga .....	10
1.3.2. Uloga infiltrirajućih stanica u patofiziologiji ishemijskoga oštećenja mozga .....	14
1.3.3. Uloga astrocita u patofiziologiji ishemijskoga oštećenja mozga.....	18
1.4. Receptori nalik na Toll – TLR.....	20
1.5. Receptori TLR2 u ishemijskoj ozljedi mozga .....	27
1.6. <i>In vivo</i> oslikavanje transkripcijske aktivacije <i>Tlr2</i> mjerenjem bioluminiscencije.....	29
<b>2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA .....</b>	<b>33</b>

<b>3. UZORCI I POSTUPCI.....</b>	<b>34</b>
3.1. Pokusne životinje.....	34
3.2. Genotipizacija miševa.....	35
3.3. Primjena posebnih dijetnih režima.....	37
3.4. Izazivanje ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja mozga na mišjem modelu – metoda privremene okluzije srednje moždane arterije .....	37
3.5. Priprema tkiva za histološke analize.....	39
3.5.1. Perfuzijska fiksacija tijela miša .....	40
3.5.2. Izolacija mozga, postfiksacija i krioprotekcija .....	40
3.5.3. Rezanje mišjeg mozga na kriostatu i pohrana uzoraka .....	41
3.6. Bojenje presjeka mišjeg mozga prema Nisslu .....	41
3.7. Procjena volumena moždane ishemijske lezije i statistička analiza .....	42
3.8. Hibridizacija RNA <i>in situ</i> sandom obilježenom radioaktivnim izotopom .....	43
3.8.1. Priprema tkiva za postupak hibridizacije RNA <i>in situ</i> .....	43
3.8.2. Prehibridizacija .....	44
3.8.3. Priprema radioaktivnim izotopom obilježene sonde.....	44

3.8.4. Hibridizacija.....	45
3.8.5. Posthibridizacija i autoradiografija.....	45
3.8.6. Vizualizacija hibridizacije RNA <i>in situ</i> pomoću fotografske emulzije.....	46
3.9. Imunohistokemija sa sekundarnim protutijelom obilježenim biotinom.....	46
3.10. Stereološka procjena broja apoptotičnih i CD3 <sup>+</sup> stanica.....	48
3.11. Imunohistokemija s fluorescentno obilježenim sekundarnim protutijelima.....	48
3.12. Kvantifikacija intenziteta fluorescentnog signala i statistička analiza.....	51
3.13. Obilježavanje proliferirajućih stanica bromodeoksiuridinom.....	52
3.14. Analiza izražaja upalnih citokina pomoću RayBio <sup>®</sup> membrane.....	53
3.14.1. Priprema uzoraka, inkubacija na RayBio <sup>®</sup> membranama i vizualizacija signala.....	53
3.14.2. Kvantifikacija signala i statistička analiza.....	54
3.15. Protočna citometrija i analiza broja upalnih stanica.....	56
3.15.1. Priprema stanica za protočnu citometriju.....	56
3.15.2. Obilježavanje stanica fluorescentnim protutijelima.....	57
3.15.3. Protočna citometrija i strategija razvrstavanja stanica.....	58
3.16. Metoda oslikavanja izražaja molekula u stvarnom vremenu - <i>in vivo</i> bioluminiscencija.....	58

3.17. Neurološka procjena miševa .....	60
3.18. Plan istraživanja sa prikazanim brojem korištenih miševa .....	62
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>63</b>
4.1. Stanice mikroglije/makrofazi pojačano izražavaju TLR2 u odgovoru mozga na ishemijsko oštećenje.....	63
4.2. Promijenjeni aktivacijski profil stanica mikroglije/makrofaga u miševa s onemogućenim <i>Tlr2</i> genom.....	65
4.3. Smanjena razina kemokina MCP-1 i smanjeni broj CD45 <sup>visoki</sup> /CD11b <sup>+</sup> stanica u mozgu miša sa onemogućenim <i>Tlr2</i> genom nakon MCAO.....	69
4.4. Smanjeni broj limfocita prisutnih na mjestu ishemijske lezije u miševa s onemogućenim <i>Tlr2</i> genom .....	74
4.5. Smanjena proliferacija rezidentnih stanica mikroglije u miševa sa onemogućenim <i>Tlr2</i> genom nakon ishemijske lezije.....	75
4.5. Galektin-3 je potreban za adekvatnu indukciju TLR2 i aktivaciju mikroglijalnih stanica.....	81
4.6. Odgođeno odumiranje neurona i egzacerbacija ishemijske ozljede u miševa sa onemogućenim <i>Tlr2</i> genom.....	83
4.7. Snižena razina IGF-1 u mozgu miševa s onemogućenim <i>Tlr2</i> genom nakon ishemijske ozljede .....	90

4.8. Poremećeno nakupljanje astrocita na mjestu ishemijske lezije u <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup> miševa .....	93
4.9. Neurološki status miševa s onemogućenim <i>Tlr2</i> genom nakon MCAO.....	95
4.10. Modulacija funkcionalnog TLR2 odgovora pomoću dijeta bogate omega-3 nezasićenim masnim kiselinama .....	97
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>99</b>
5.1. Receptori TLR2 sudjeluju u odgovoru mozga na ishemijsko oštećenje, a uloga receptora TLR2 u razvoju ishemijske lezije ovisna je o vremenu. ....	99
5.2. Postishemijski upalni odgovor mozga posredovan je TLR2 receptorima izraženima na populaciji stanica mikroglije/makrofaga. ....	102
5.3. Aktivacija stanica mikroglije/makrofaga ovisi o funkcionalnom TLR2 receptoru. ....	103
5.4. TLR2 sudjeluje u proliferaciji stanica mikroglije, te u regrutiranju upalnih stanica monocita/makrofaga i limfocita iz cirkulacije. ....	104
5.5. Postishemijska proliferacija rezidentnih stanica mikroglije ovisi o interakciji TLR2 receptora i galektina-3.....	106
5.6. Odgovor mozga na ishemijsku leziju posredovan TLR2 receptorima uzrokuje stvaranje povoljnog mikrookoliša potrebnog za pravilan razvoj lezije .....	107
5.7. Nakupljanje astrocita na području oko ishemijske lezije smanjeno je u miševa sa onemogućenim <i>Tlr2</i> genom.....	108



5.8. TLR2 posredovani upalni odgovor moguće je modulirati pomoću dijetе bogate omega-3 nezasićenim masnim kiselinama, što rezultira zaštitnim učinkom...	109
5.9. Terapijski pristup ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi mozga.....	111
5.10. Dvostruka uloga upale u ishemijskoj ozljedi mozga .....	115
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>117</b>
<b>7. SAŽETAK .....</b>	<b>121</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>122</b>
<b>9. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>123</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>142</b>

## **POPIS KRATICA**

AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol-propionska kiselina - ionotropni glutamatni receptor
AP-1	<i>engl. activator protein-1</i> - aktivacijski protein 1
APAF1	<i>engl. apoptosis-activating factor 1</i> - čimbenik aktivacije apoptoze
APC	<i>engl. antigen presenting cells</i> - stanice koje predaju antigene
ATP	adenozin trifosfat
A $\beta$	beta amiloid
BDNF	<i>engl. brain-derived neurotrophic factor</i> - neurotrofni čimbenik porijeklom iz mozga
BrdU	5-bromo-2'-deoksiuridin
CARD	<i>engl. caspase recruitment domains</i> - domene za aktiviranje kaspaza
CCD	<i>engl. charge coupled device</i> - nabojem spregnuti sklop
CD	<i>engl. cluster of differentiation</i> - stanični diferencijacijski antigen
COX	ciklooksigenaza
CpGODN	citozin-fosfo-guanin oligodeoksinukleotid
cPLA2	<i>engl. cytosolic calcium-dependent phospholipase A2</i> - kalcij-ovisna citoplazmatska fosfolipaza A2
CX <sub>3</sub> CR <sub>1</sub>	receptor za kemokin fraktalkin
DAB	3, 3'-diaminobenzidin
DAMP	<i>engl. danger/damage associated molecular patterns</i> - molekularni uzorci pridruženi ozljedi/opasnosti
DHA	dokozaheksaenoična kiselina
DNA	deoksiribonukelinska kiselina
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
FGF-2	<i>engl. fibroblast growth factor-2</i> - čimbenik rasta fibroblasta 2
Fluc	<i>engl. Firefly luciferase</i> – luciferaza dobivena iz krijesnice
GABA	gama aminomaslačna kiselina
Gal-3	galektin-3
GDNF	<i>engl. glia derived neurotrophic factor</i> - neurotrofni čimbenik porijeklom iz glija stanica
GFAP	<i>engl. glial fibrillary acidic protein</i> - glijalni kiseli nitasti protein

GFP	<i>engl. green fluorescent protein</i> - zeleni fluorescentni protein
HRP	<i>engl. horseradish peroxydase</i> - peroksidaza hrena
HSP	<i>engl. heat shock proteins</i> - proteini toplinskog šoka
IAP	<i>engl. inhibitor of apoptosis</i> - inhibitor apoptoze
IF	imunofluorescencija
IFN- $\gamma$	interferon gama
Ig	imunoglobulin
IGF	<i>engl. insuline-like growth factor</i> - čimbenik rasta nalik na inzulin
IKK	I $\kappa$ B kinaza
IL	interleukin
IOD	integrirana optička gustoća
IRAK	kinaza udružena s interleukin-1 receptorom
LPA	lipofosfatidna kiselina
LPS	lipopolisaharid
LTA	lipoteikoična kiselina
MBP	<i>engl. myelin basic protein</i> - bazična bjelančevina mijelina
MCP-1	<i>engl. monocyte chemoattractant protein-1</i> - monocitni kemoatraktantni protein 1
MHC	<i>engl. major histocompatibility complex</i> - glavni kompleks gena tkivne podudarnosti
MIP-1 $\alpha$	<i>engl. monocyte inhibitory protein</i> - monocitni inhibitorni protein 1 alfa
MMP	metaloproteinaze matriksa
mRNA	glasnička ribonukelinska kiselina
MSH	melanocitni stimulirajući hormon
NEMO	<i>engl. NF-<math>\kappa</math>B essential modulator</i> - esencijalni modulator NF- $\kappa$ B
Neo	alel za neomicinsku rezistenciju
NGF	<i>engl. nerve growth factor</i> - čimbenik rasta živaca
NMDA	N-metil-D-aspartat - ionotropni glutamatni receptor
NOS	<i>engl. nitric oxide synthase</i> - dušikov-oksidi sintaza
NRL	<i>engl. NOD-like receptors</i> - receptori nalik na NOD
PAF	<i>engl. platelet activating factor</i> - čimbenici aktivacije trombocita
PAMP	<i>engl. pathogen associated molecular patterns</i> - molekularni uzorci patogenih mikroorganizama
PARP	poli (ADP-riboza) polimeraza
PCR	<i>engl. polymerase chain reaction</i> - metoda lančane reakcije polimerazom

<i>PFA</i>	paraformaldehid
<i>Ppi</i>	pirofosfat
<i>PRR</i>	<i>engl. pattern recognition receptors</i> - receptori koji prepoznaju uzorak
<i>rtPA</i>	<i>engl. recombinant tissue Plasminogen Activator</i> - rekombinantni aktivator tkivnog plazminogena
<i>sPLA2</i>	<i>engl. secreted calcium-dependent phospholipase A2</i> - kalcij-ovisna sekretorna fosfolipaza A2
<i>TCR</i>	<i>engl. T-Cell Receptor</i> - receptor T limfocita
<i>TGF-β</i>	<i>engl. transforming growth factor beta</i> - transformirajući čimbenik rasta beta
<i>TLR</i>	<i>engl. Toll-like receptor</i> - receptor nalik na Toll
<i>tMCAO</i>	<i>engl. transient middle cerebral artery occlusion</i> - metoda privremene intraluminalne okluzije srednje moždane arterije
<i>TNF-α</i>	<i>engl. tumor necrosis factor alpha</i> - čimbenik nekroze tumora alfa
<i>TRAF</i>	<i>engl. TNF Receptor Associated Factor 6</i> - TNF receptoru pridruženi faktor
<i>VIP</i>	vazoaktivni intestinalni peptid
<i>Wt</i>	<i>engl. wild type</i> - divlji tip

## **1. UVOD**

### **1.1. Moždani udar i ishemijska ozljeda mozga**

Prema podacima iz 2002. godine, na svjetskoj razini od moždanog udara godišnje oboli 15 milijuna ljudi, od čega umire 5,5 milijuna ljudi (10 % sveukupne svjetske smrtnosti), a oko 5 milijuna bolesnika ostaje s trajnim tjelesnim oštećenjima (1). Prema novijim podacima iz 2012. godine, u Sjedinjenim Američkim Državama 800 000 ljudi godišnje pretrpi neki oblik moždanog udara, dok od tog broja 150 000 ljudi umire od posljedica moždanog udara (2). U skladu s navedenim statistikama, moždani udar nalazi se na trećem mjestu uzroka smrtnosti i na prvom mjestu uzroka invalidnosti u svijetu (3,4). Temeljem navedenih statističkih podataka moždani udar predstavlja veliko socioekonomsko opterećenje zbog narušene kvalitete života, kako oboljele osobe, tako i okoline u kojoj se nalazi; a također i zbog velikih ekonomskih izdataka potrebnih za liječenje, rehabilitaciju i skrb o bolesnicima, koja je u velikom broju slučajeva doživotna.

Prema uzroku nastanka, moždani udar dijeli se na ishemijski i hemoragijski moždani udar. Prema učestalosti, ishemijski moždani udar javlja se češće te čini 85% svih moždanih udara, dok preostalih 15% čine hemoragijski moždani udari (1). Prema mehanizmu nastanka, ishemijski moždani udari dijele se na trombotske, embolijske, te na moždane udare koji su nastali kao posljedica sistemske hipoperfuzije. Trombotski i embolijski moždani udari najčešće uzrokuju začepljenje jedne krvne žile, a u njenom opskrbnom području posljedično se javlja fokalno ishemijsko oštećenje. S druge strane, sistemska hipoperfuzija najčešće uzrokuje ishemiju u različitim regijama mozga koje se nalaze na granicama opskrbnih područja velikih moždanih arterija (5). Tromboembolijski moždani udar čini većinu nastalih ishemijskih moždanih udara (u literaturi se često naziva samo ishemijski moždani udar), a u njegovoj podlozi nalazi se ishemijska ozljeda mozga koja će biti proučavana u ovom istraživanju.

Unatoč značajnom napretku rehabilitacijske terapije u području liječenja posljedica moždanog udara, za sada je jedina odobrena terapija u akutnoj fazi tromboembolijskog ishemijskog moždanog udara postupak trombolize primjenom rekombinantnog aktivatora tkivnog plazminogena (rtPA – engl. *recombinant tissue Plasminogen Activator*). Terapijsko

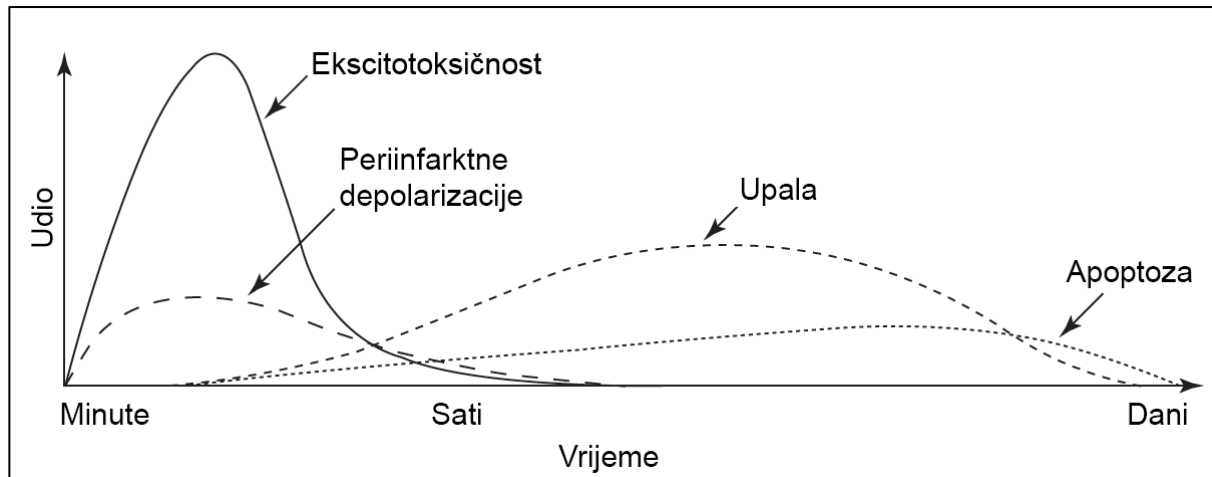
razdoblje u kojemu je primjena rtPA opravdana (tzv. "vremenski prozor") do nedavno je iznosilo 3 h od trenutka nastanka simptoma ishemijskog moždanog udara (6). Nedavno je navedeno razdoblje prošireno na 4,5 h od trenutka nastanka ishemije (7). Međutim, unatoč proširenom vremenskom prozoru, manje od 5% bolesnika primi trombolitičku terapiju rtPA u navedenom vremenskom periodu, dok ostaloj većini bolesnika (>95%) preostaje tek potporna terapija u obliku intenzivne njege (8). Znatni naponi u prevenciji moždanog udara snizili su razinu incidencije te posljedično mortaliteta, dok je uvođenje specijalizirane intenzivne njege barem djelomice poboljšalo krajnji funkcionalni ishod bolesnika oboljelih od moždanog udara (9).

Razvoj novih terapijskih pristupa u liječenju moždanog udara postao je jedan od prioritarnih ciljeva bazičnih i primijenjenih istraživanja u području neuroznanosti. Podlogu razvoja svih novih terapijskih mogućnosti čine bazična istraživanja, koja nastoje objasniti (pato)fiziološke mehanizme koji se odvijaju u podlozi neke bolesti. Ovdje prikazano istraživanje objašnjava ulogu receptora TLR2 (engl. *Toll-like receptor 2* - receptor nalik na Toll 2) u odgovoru mozga na nastalo ishemijsko oštećenje.

## **1.2. Patofiziološka kaskada događaja u ishemijskom oštećenju mozga**

Ishemijsko oštećenje mozga rezultat je kompleksnog slijeda patofizioloških događaja koji imaju izraženu vremensku i prostornu komponentu, a događaju se uslijed privremenog ili trajnog smanjenja protoka krvi u mozgu. Najznačajniji patofiziološki mehanizmi koji se javljaju u uvjetima ishemije su ekscitotoksičnost, periinfarktne depolarizacije, upala i programirano odumiranje stanica, tj. apoptoza. U ranoj fazi (unutar nekoliko sati) dolazi do pojave ekscitotoksičnosti, periinfarktne depolarizacije, nekroze te početne faze upalnog odgovora; dok se u kasnijoj fazi odgovora javlja jasno izražena upala i apoptoza stanica (4). Ovdje je važno naglasiti kako navedeni procesi nisu jasno razgraničeni u vremenu i prostoru. Naime, vjerojatnost pojave pojedinog procesa ovisi o vremenskom periodu koji je prošao od trenutka nastanka začepljenja krvne žile, te o prostornoj udaljenosti područja koje promatramo od središta nastale ishemijske lezije. Razvoj pojedinih patofizioloških događaja u vremenskom slijedu nakon nastanka ishemije, te značaj događaja s obzirom na krajnji ishod (nastalo oštećenje), prikazani su na *Slici 1*. Ukoliko nakon nastalog perioda ishemije nastupi ponovna uspostava krvotoka kroz začepljenu krvnu žilu (reperfuzija), paradoksalno dolazi do

naknadnog oštećenja u području ishemijske ozljede, budući da dolazi do pojačanog stvaranja slobodnih kisikovih radikala koji mogu složenim mehanizmima djelovati štetno na preživjele stanice (10). Ishemijsko oštećenje udruženo s oštećenjem nastalim zbog rekanalizacije krvne žile i posljedične reperfuzije naziva se ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom.



*Slika 1.* Shematski prikaz kaskade patofizioloških događaja nakon nastanka ishemijske lezije mozga. Vrlo rano nakon nastanka fokalnog perfuzijskog deficita, ekscitotoksični mehanizmi oštećuju neurone i glija stanice, koji posljedično odumiru. Ekscitotoksičnost uzrokuje nastanak periinfarktne depolarizacije, nakon čega slijedi razvoj upale i apoptoze (programiranog odumiranja stanica). Apscisa predstavlja razvoj događaja u vremenu, dok ordinata prikazuje udio pojedinog patofiziološkog događaja u konačnom ishodu (oštećenju). Preuzeto i prilagođeno iz (4).

U ljudskome tijelu, udio težine mozga u ukupnoj tjelesnoj težini iznosi 2%, dok udio protoka krvi kroz mozak iznosi 15% ukupnog protoka krvi u tijelu. Energetske potrebe mozga obuhvaćaju 20% ukupne potrošnje kisika u tijelu, te 25% ukupne potrošnje glukoze u tijelu. Energetski metabolizam živčanih stanica utemeljen je gotovo isključivo na procesu oksidativne fosforilacije (11). Narušen moždani protok krvi onemogućava dotok potrebnih substrata metabolizma (kisika i glukoze), te narušava proizvodnju energije kojom se održavaju membranski ionski gradijenti (12, 13). Nedostatna proizvodnja energije dovodi do gubitka membranskog potencijala, što uzrokuje depolarizaciju živčane stanice (14). Posljedično se aktiviraju kalcijски kanali ovisni o naponu što dovodi do pojačanog otpuštanja

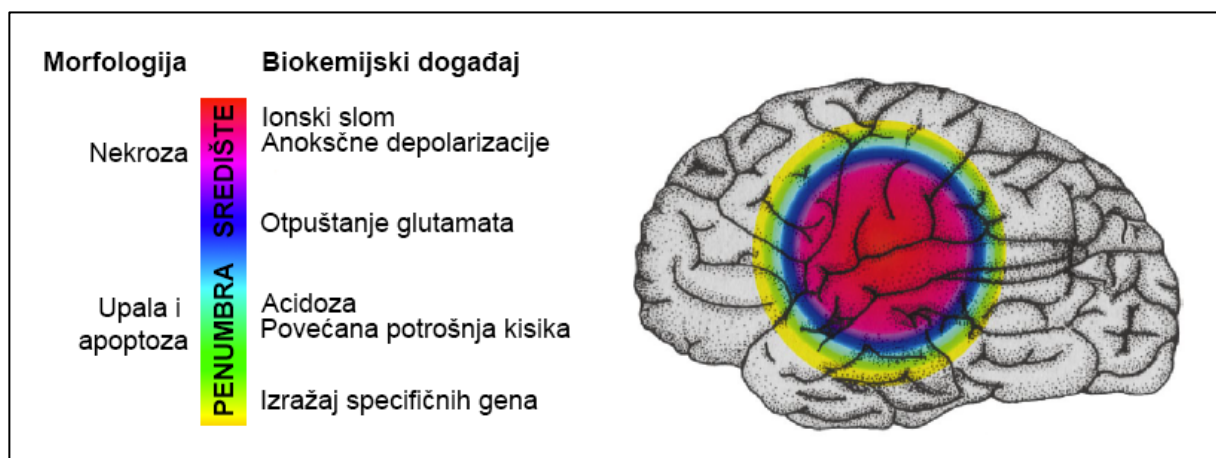
ekscitacijskih neurotransmitera u izvanstanični prostor. U isto vrijeme, zbog nedostatne proizvodnje energije, onemogućena je ponovna pohrana ekscitacijskih aminokiselina u presinaptički završetak, što dodatno pojačava nakupljanje ekscitacijskog neurotransmitera glutamata u izvanstaničnom prostoru.

Aktivacijom NMDA (N-metil-D-aspartat) receptora i metabotropnih glutamatnih receptora u stanici dolazi do pojačane aktivacije fosfolipaze C i povišene razine inozitol-trifosfata (IP<sub>3</sub>), što rezultira previsokom koncentracijom iona kalcija unutar stanice (15). U isto vrijeme, kao rezultat prekomjerne stimulacije živčane stanice glutamatom, ioni natrija i klora ulaze stanicu putem ionotropnih glutamatnih AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol-propionska kiselina) receptora. Budući da je ulazak iona natrija i klora veći od izlaska iona kalija, dolazi do ulaska vode u stanicu. Makroskopski gledano, nastaje edem mozga, koji dodatno ometa krvnu opskrbu područja koje se nalazi oko središta ishemije. Povišena koncentracija kalcija započinje brojne citoplazmatske i nuklearne događaje koji utječu na razvoj ishemijske lezije, među kojima važno mjesto ima aktivacija proteolitičkih enzima koji degradiraju proteine citoskeleta, primjerice aktin, spektrin, te proteine izvanstaničnog matriksa, kao što je laminin (16,17). Aktivacijom kalcij-ovisne citoplazmatske fosfolipaze A2 (cPLA2 – engl. *cytosolic calcium-dependent phospholipase A2*) dolazi do hidrolize membranskih fosfolipida, te oslobađanja slobodnih masnih kiselina, uključujući arahidonsku kiselinu. Metaboliziranjem arahidonske kiseline stvaraju se slobodni kisikovi radikali, koji imaju ulogu signalnih molekula te aktiviraju upalu i apoptozu. Aktivacijom kalcij-ovisne sekretorne fosfolipaze A2 (sPLA2 – engl. *secreted calcium-dependent phospholipase A2*) dolazi do hidrolize kardiolipina, čime se razara mitohondrijski respiratorni lanac, te dolazi do dodatne proizvodnje slobodnih kisikovih radikala (18). Dušikov oksid, spoj kojeg sintetizira enzim ovisan o kalciju - dušikov-oksidsintaza (engl. *NOS - nitric-oxide synthase*), reagira sa superoksidnim anionima, što rezultira proizvodnjom visoko reaktivnih spojeva – peroksinitrita, koji naknadno oštećuju tkivo (19, 20). Međutim, u isto vrijeme proizvodnja dušičnog oksida od strane endotelne stanice može djelovati neuroprotektivno, jer poboljšava tkivnu perfuziju (21). Slobodni kisikovi radikali razaraju unutarnju mitohondrijsku membranu i uzrokuju oksidaciju bjelančevina koje sudjeluju u transportu elektrona, izbacivanju vodikovih iona i proizvodnju ATP-a (22).



Na mitohondrijskoj membrani stvaraju se pore, te ona postaje propusna, što uzrokuje bubrenje mitohondrija, prestanak proizvodnje ATP-a, te dodatni nastanak slobodnih kisikovih radikala (23). Kao posljedica stvaranja pora na mitohondrijskoj membrani, dolazi do otpuštanja citokroma C iz mitohondrija u citoplazmu, što posljedično aktivira programiranu staničnu smrt – apoptozu (24).

Hemodinamske, metaboličke i ionske promjene koje su prethodno opisane ne zahvaćaju ravnomjerno cijelo područje ishemijske lezije. Morfološki i patofiziološki gledano, nakon žarišne ishemijske u moždanom tkivu nastaju dvije zone: središnja zona nekroze u kojoj je protok krvi ispod 20% normalnog protoka krvi kroz mozak (25), te periferna zona hipoperfuzije, tzv. zona penumbre. U zoni nekroze neuroni se nalaze u stanju trajne anoksične depolarizacije već nekoliko minuta nakon nastanka ishemijske. Slom ionske homeostaze i nastanak ukupnog bioenergetskog sloma uzrokuju pojavu lipolize, proteolize, te razgradnje mikrotubula, što rezultira brzim odumiranjem stanica. (26). Između ireverzibilno oštećene zone i zdravog tkiva nalazi se zona penumbre s oslabljenim protokom krvi, (20-40% normalnog protoka krvi kroz mozak) (27). Energetski metabolizam u toj zoni je djelomično očuvan (Slika 2). Ukoliko se na vrijeme ne primjeni trombolitička terapija, penumbra može postati zona infarkta, budući da procesi ekscitotoksičnosti, nastanka periinfarktne depolarizacije, postishemijske upale ili apoptoze djeluju štetno i mogu dovesti do dodatnog oštećenja živčanih stanica koje se nalaze u zoni penumbre. (4, 28, 29).



Slika 2. Područje penumbre. Područje ishemijske lezije mozga s djelomično očuvanom perfuzijom, koja okružuje središte ishemijske lezije. Nakon nastanka ishemijske, jezgra i penumbra ishemijske ozljede mijenjaju se u vremenu i prostoru. Pritom je važno naglasiti

kako se biokemijski događaji koji se odvijaju u području penumbre znatno razlikuju od onih u središtu ishemijske lezije. Preuzeto i prilagođeno iz (4).

---

Zbog nastalog energetske deficita u oba područja dolazi do pojačanog otpuštanja glutamata u okolinu, što dovodi do pojave depolarizacije ishemičnih živčanih stanica. Prisutnost glutamata u nekrotičnom središtu uzrokuje nastanak trajnih anoksičnih depolarizacija okolnih živčanih stanica koje se zbog nastalog energetske deficita više ne mogu repolarizirati. U zoni penumbre stanice se nalaze u području s djelomično očuvanom perfuzijom pa se mogu repolarizirati, ali na račun pojačane energetske potrošnje. Iste stanice mogu se ponovno depolarizirati kao odgovor na povećanu koncentraciju glutamata koji se nakuplja u izvanstaničnom prostoru što se naziva terminom "periinfarktne depolarizacije". Periinfarktne depolarizacije uočene su na životinjskim modelima miša, štakora i mačke, a javljaju se nekoliko puta u sat vremena, tijekom šest do osam sati nakon nastanka ishemijske lezije. Kako broj depolarizacija raste, tako se povećava veličina ishemijske lezije (4). Nakon nekoliko desetljeća nagađanja javljaju li se periinfarktne depolarizacije i u ljudi, one su zabilježene metodom subduralne elektrokortikografije, a uočeno je kako se javljaju vrlo često, te imaju važnu ulogu u daljnjem širenju nastale ishemijske lezije (30).

Stanice mozga koje su ugrožene pretjeranom aktivacijom glutamatnih receptora, previsokom koncentracijom kalcijevih iona, kisikovim radikalima te oštećenjem mitohondrija ili DNA, mogu odumrijeti procesima nekroze ili apoptoze. Kojim će mehanizmom stanica odumrijeti, ovisi o prirodi i jačini podražaja, vrsti stanice, u kojem se stadiju staničnog ciklusa nalazi ili na kojem se stupnju razvoja nalazi (31). Nekroza je dominantna nakon akutne trajne okluzije krvne žile, dok je u blažim ozljedama češća programirana smrt stanica apoptozom, koja se također uočava i u penumbri (32). Geni za kaspaze, kao i geni koji suprimiraju (*Bcl2*, *Iap*) ili pojačavaju (*Bad*, *TP53*) staničnu smrt izraženi su tijekom odgovora mozga na ishemijsku leziju. Aktivirane kaspaze su enzimi koji aktiviraju bjelančevine zadužene za homeostazu i popravke unutar stanice, koje razgrađuju pojedine dijelove stanice i uzrokuju njezino odumiranje. Više od 30 bjelančevina može biti cijepano kaspazama, uključujući bjelančevine citoskeleta, PARP (engl. *poly (ADP-ribose) polymerase*) - enzim koji popravljiva greške na DNA, a također mogu cijepati i druge kaspaze. Među 12 otkrivenih kaspaza ustanovljeno je kako kaspaze 1 i 3 imaju ključnu ulogu u programiranoj staničnoj smrti nakon ishemijske ozljede mozga. Još uvijek je relativno malo poznato o tome koje molekule aktiviraju sustav

kaspaza, ali postoje uvjerljivi dokazi o ulozi citokroma C, koji se otpušta iz mitohondrija i aktivira apoptosomski kompleks, kojeg čine APAF1 (engl. *apoptosis-activating factor 1*) i prokaspaza-9 u prisutnosti dATP-a. Stvaranje i aktivacija apoptosomskog kompleksa potiče cijepanje i aktivaciju kaspaze-3 (33). Drugi članovi obitelji kaspaza važni su u kasnijim stadijima nakon nastale ishemijske ozljede mozga, kada se povisuje razina mRNA kaspaza 1, 2, 3 i 8. Istraživanja u kojima je blokiran učinak kaspaze-3 specifičnim inhibitorom pokazala su smanjeni neurološki deficit i smanjenu veličinu lezije u eksperimentalnom modelu ishemijske lezije, neonatalne hipoksično-ishemijske ozljede (34, 35), kao i u modelu traumatskog oštećenja mozga (36)(4).

Rekanalizacija koja nastaje kao posljedica terapijske intervencije ili endogenog otapanja ugruška, uzrokuje ponovnu dostavu kisika u ishemijski oštećeno tkivo. Ukoliko je reperfuzija uspostavljena, u oligemičnom tkivu u kojemu je očuvana barem minimalna perfuzija, može doći do očuvanja integriteta stanica i nastanka minimalnih ili nikakvih posljedica ishemije. Ukoliko reperfuzija nastupi u tkivu u kojemu je nastalo ireverzibilno oštećenje stanica, a koje se nalazi na rubu između središta ishemijske lezije i penumbre, može doći do naknadnog nastanka oštećenja ugroženog tkiva penumbre (37). Naime, u tom području se javljaju brojni patofiziološki mehanizmi, koji rezultiraju masivnim povećanjem koncentracije ekscitacijskih neurotransmitera, pojačanom proizvodnjom slobodnih kisikovih radikala, te pojačanim ulaskom kalcija u ugrožene stanice, tj. događaja koji uzrokuju naknadno oštećenje stanica. Nastajanje reaktivnih kisikovih radikala u uvjetima reperfuzije posebno je izraženo na mitohondrijima endotelnih stanica krvnih žila koje se nalaze u ishemijski ugroženom području, gdje dolazi do pojačanog stvaranja reaktivnih kisikovih radikala, prvenstveno superoksida. Drugi važan izvor kisikovih radikala u stijenci krvnih žila tijekom ishemijsko reperfuzijske ozljede su enzimi kao što je NADPH oksidaza, koja je također izražena u cerebrovaskularnom endotelu. Uz navedeno, povišena unutarstanična razina kalcija koja se javlja u uvjetima ishemije aktivira endotelnu dušikov-oksidad sintazu (eNOS), koja postaje važan izvor dušikovog oksida. NO ima jači afinitet vezanja za nastali superoksid od superoksid dismutaze, što rezultira stvaranjem vrlo jakih oksidansa, peroksinitrita. Peroksinitriti su vrlo reaktivni spojevi koji imaju jača oksidacijska svojstva od superoksida i NO, a također ostaju i duže prisutni u oštećenom tkivu (10). Nastali reaktivni radikali sa jakim oksidativnim svojstvima uzrokuju naknadno oštećenje krvno moždane barijere, sa posljedičnim razvojem edema. Uz navedeno, reaktivni kisikovi radikali uzrokuju štetu

procesima lipidne peroksidacije, reakcijama sa nukleotidnim bazama, interakcijom s enzimima zaduženim za popravak DNA, reakcijama sa unutarstaničnim signalnim bjelančevinama, te smanjenjem nastanka dušikovog oksida (37).

U odgovoru mozga na nastalo ishemijsko oštećenje dolazi do aktivacije kompleksnog slijeda događaja koji se naziva pojmom "endogena neuroprotekcija". Endogena neuroprotekcija obuhvaća lokalne i udaljene mehanizme zaštite koji se aktiviraju s ciljem smanjenja oštećenja mozga ishemijskom ozljedom, te ponovnom uspostavom tkivne homeostaze. Naime, ishemijsko oštećenje mozga uzrokuje posljedični porast arterijskog tlaka u tijelu, primjerice, putem aktivacije simpatičkog autonomnog živčanog sustava (38), koji se javlja s ciljem povećanja perfuzije ishemičnog tkiva putem kolateralnih krvnih žila koja dolaze iz područja sa neometenom perfuzijom (39). Poticanje lokalne cirkulacije također je olakšano lokalnim oslobađanjem potentnih vazodilatatora, kao što su adenzin, vazoaktivni ioni kalija i vodika, te dušikov oksid (40). Uz poboljšanje perfuzije, utjecaj energetske deplecije oslabljen je smanjenjem energetske potrebe ishemičnog moždanog tkiva suprimiranjem neuralne aktivnosti i sinteze bjelančevina (41, 42). Nakon početne aktivacije, NMDA receptori postaju neosjetljivi, a otpuštanje inhibitornih neurotransmitera smanjuje sinaptičku aktivnost i nastoji ograničiti štetan utjecaj ekscitotoksičnosti (43). U isto vrijeme, inhibitori apoptoze Bcl-2 i IAP (engl. inhibitor of apoptosis), te HSP (engl. *heat shock proteins* - proteini toplinskog šoka) se pojačano izlučuju, a Akt signalni put ublažava proapoptotski signalni put koji je stimuliran uslijed ishemijske ozljede (44). Protuupalni i neuroprotektivni citokini IL-10 i TGF- $\beta$  (engl. *transforming growth factor beta* - transformirajući čimbenik rasta beta), izlučeni od strane regulatornih limfocita T, djeluju na način da ograničavaju invaziju leukocita i suprimiraju prirodni i stečeni imunološki odgovor, štiteći preživjele neurone. U isto vrijeme dolazi i do značajnog smanjenja sistemskog imunološkog odgovora, što naknadno smanjuje aktivnost prirodnog i stečenog imunološkog odgovora aktiviranog ishemijskom ozljedom (45).

Zaštitni učinci koji se javljaju u kasnijim fazama odgovora mozga na ishemijsko oštećenje djeluju na način da stimuliraju reparatorne procese koji se javljaju u oštećenom mozgu. Stanice mikroglije, makrofaga, neurona, astrocita, i endotelne stanice izlučuju čimbenike rasta, od kojih neki, primjerice eritropoetin i IGF-1 (engl. *insuline-like growth factor* - čimbenik rasta nalik na inzulin) također dolaze i iz udaljenih organa, te ulaze u mozak putem krvnih žila (46 - 48). Ujedno, glutamatergička sinaptička aktivnost uzrokuje indukciju

neurotrofnog čimbenika BDNF (*engl. brain-derived neurotrophic factor* - neurotrofni čimbenik porijeklom iz mozga) putem aktivacije CREB (*engl. cAMP response element-binding protein*) čimbenika prepisivanja (49). Neuron koji prežive ishemijsku ozljedu pružaju nove nastavke pokušavajući ponovno uspostaviti oštećene veze s okolnim neuronima (50). U isto vrijeme, na životinjskom modelu je uočeno kako neuronalne prekursorske stanice pristižu u oštećeno područje (51), a stanice porijeklom iz koštane srži pridonose stvaranju mikrovaskularne mreže u mozgu (52). Navedeni procesi utječu na ponovnu uspostavu tkivne homeostaze s ciljem reorganizacije izvanstaničnog matriksa, nadomještanja odumrlih stanica, te ponovne uspostave neuronskih krugova (53).

Temeljem prethodno navedenog, možemo zaključiti kako se za vrijeme nastanka ishemijske ozljede u isto vrijeme odvijaju s jedne strane razorni procesi koji dovode do stanične smrti, a s druge strane lokalni i sistemski zaštitni procesi koji djeluju kao protuteža razornim procesima. Unatoč činjenici da razorni procesi koji se odvijaju u patofiziologiji ishemijske ozljede tkiva na kraju ipak prevagnu, u isto vrijeme samozaštitni (neuroprotektivni) mehanizmi djeluju na način da stvaraju uvjete potrebne za kasniji oporavak i reorganizaciju, tj. procese koji će uslijediti u kasnijoj fazi nakon nastale ishemijske ozljede mozga (53).

### **1.3. Uloga upale u patofiziologiji ishemijskoga oštećenja mozga**

Imunološki sustav sudjeluje u svim komponentama patofiziološke kaskade događaja nakon ishemijskoga oštećenja mozga; od najranijih događaja kao što je začepljenje krvne žile, pa sve do kronične faze odgovora mozga na ishemijsko oštećenje, tj. tijekom regenerativnih procesa koji se javljaju uslijed oporavka. Upalni odgovor mozga na ishemijsko oštećenje karakteriziran je brzom aktivacijom rezidentnih upalnih stanica (najznačaniju izvršnu ulogu imaju stanice mikroglije), nakon čega slijedi infiltracija tkiva upalnim stanicama iz krvotoka u područje ishemijske lezije, tj. transendotelna migracija granulocita (neutrofila), monocita/makrofaga i limfocita (54).

Prema specifičnosti i brzini odgovora, navedene stanice se mogu podijeliti na stanice prirođenog i stečenog imunološkog sustava. Prirođeni imunološki sustav aktivira se neposredno nakon začepljenja krvne žile zahvaljujući prisutnosti receptora koji imaju vrlo malu specifičnost, kako bi se pokrio čim širi spektar liganada koji upućuju na patološko

zbivanje u okolini. Sastavnice prirodnog imunološkog odgovora u mozgu koje sudjeluju u ishemijskom oštećenju uključuju stijenku krvne žile (endotelne stanice); rezidentne upalne stanice (prisutne u središnjem živčanom sustavu – stanice mikroglije, perivaskularni makrofazi, dendritičke stanice i mastociti); te upalne stanice koje se u normalnim uvjetima nalaze u cirkulaciji, a uslijed patološkog zbivanja prelaze u tkivo u kojemu se nalazi nastala upala/ozljeda (najznačajniji su neutrofil i monociti/makrofazi). Astrociti, također rezidentne stanice mozga, iako ne pripadaju imunološkom sustavu, imaju važnu ulogu već u najranijoj fazi odgovora na ishemijsku leziju, ali i moduliranju upalnog odgovora te u procesima cijeljenja, tj. stvaranja glijalnog ožiljka.

Stečeni imunološki odgovor uključuje procese prezentiranja antigena, klonске ekspanzije stanica protiv određenog antigena te stvaranje specifičnih imunoglobulina; procese za koje je potreban duži vremenski period te dulje izlaganje limfocita antigenu. Izvršni mehanizam stečenog imunološkog sustava temelji se na visoko specifičnim limfocitima T te na izlučenim specifičnim imunoglobulinima (45). S ciljem lakšeg praćenja ovog istraživanja, pregled zbivanja u upalnom odgovoru mozga na ishemijsku leziju biti će podijeljen na ulogu rezidentnih stanica, te na ulogu stanica koje su privučene iz cirkulacije i infiltriraju tkivo mozga nakon nastanka ishemijskoga oštećenja.

### **1.3.1. Uloga rezidentnih stanica u patofiziologiji ishemijskoga oštećenja mozga**

Stanice mikroglije najznačajnije su stanice u upalnom odgovoru mozga na ishemijsku leziju. One potječu iz hematopoetskog sustava, dio su monocitno – makrofagnog sustava i čine prirodni imunološki sustav središnjeg živčanog sustava (55, 56). Stanice mikroglije odgovaraju na bilo koju vrstu patoloških događaja reakcijom koja je poznata pod nazivom mikroglijalna aktivacija. Donedavno su smatrane kao stanice koje u fiziološkim uvjetima miruju, a u patološkim uvjetima stvaraju masivnu i burnu upalnu reakciju i djeluju proinflatorno, što u konačnici rezultira neurotoksičnim učinkom. No, teško je prihvatiti da su stanice mikroglije "čimbenik rizika" koji je prisutan u središnjem živčanom sustavu i da su se kao takve održale kroz evoluciju. Zahvaljujući novim spoznajama, opisana su svojstva stanica mikroglije koja ukazuju na njihov stabilizacijski učinak u središnjem živčanom sustavu, dok u isto vrijeme nadziru okolinu u kojoj se nalaze i aktiviraju se kada je to

potrebno (57). Morfološki gledano, stanice mikroglije u stanju mirovanja imaju razgranat izgled, sa mnogo staničnih izdanaka, a na svojoj površini izražavaju molekule koje su karakteristične za tkivne makrofage pronađene u drugim organskim sustavima. Oslikavanjem receptora za kemokin fraktalkin (CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub>) koji je izražen na površini mikroglijalnih stanica, pomoću dvofotonskog mikroskopa i metode oslikavanja u vremenskim intervalima (engl. *time lapse imaging*), pokazano je kako se izdanci mikroglijalnih stanica neprestano stvaraju i nestaju, tj. ispupčuju i povlače, nalik na pokrete filopodija. Na taj način rezidentne stanice mikroglije stalno ispituju okolinu koja je gusto prožeta nastavcima živčanih stanica. K tome, susjedne stanice mikroglije nadziru pojedine dijelove parenhima koje dijele sa susjednom stanicom mikroglije, bez stupanja u kontakt s njom. Procjena temeljena na navedenoj metodi oslikavanja je kako se područje cijelog moždanog parenhima iznova nadzire svakih nekoliko sati (58, 59). Ukoliko dođe do razvoja nekog oblika patološkog supstrata koji pobuđuje mikrogliju, naizmjenično nadziranje prerasta u usmjerenu migraciju prema mjestu lezije. To uključuje procese usmjerenog navođenja, koji najvjerojatnije ovise o stimulaciji purinoreceptora, te o pomoći astrocita (59, 60). Zbog nadzora koji stanice mikroglije vrše u okolini u kojoj se nalaze, predloženo je da se termin "mirujuća" mikroglija promijeni u "nadzornu" mikrogliju, kako bi se naglasilo aktivno stanje u kojem se stanice mikroglije nalaze, što je točnije od pojma mirovanja koji označava pasivno stanje. Na taj način pojam aktivacije mikroglije kao odgovora na patološko zbivanje označavao bi promjenu funkcionalnog fenotipa mikroglije, pa bi se takve stanice nazivale "izvršnom" mikroglijom, umjesto "aktivnom" mikroglijom (57).

U uvjetima ishemije aktivirane ("izvršne") stanice mikroglije mijenjaju svoj oblik iz razgranatog u okrugli, "ameboidni" oblik, te počinju proliferirati (57, 61). Nedavna istraživanja pokazuju kako, ovisno o stimulusu, aktivirane stanice mikroglije mogu imati koristan i/ili štetan učinak na neurone koji se nalaze u njihovoj okolini (62 - 66).

Do danas, identificirane su brojne molekule koje mogu promijeniti mirujuće, nadzorno stanje mikroglije u aktivno, izvršno stanje. Zajedničko svojstvo tih molekula je to da sve predstavljaju prijetnju strukturalnom i funkcionalnom integritetu središnjeg živčanog sustava. Kako bi komunikacija mikroglije i okoline bila precizna i nedvosmislena, mikroglijalne stanice sposobne su prepoznati široki spektar molekula, a također imaju i raznovrsan učinak na modulaciju upalnog odgovora, bilo da ga započinju, pojačavaju ili umiruju (*Tablica 1*).

Tablica 1. Primjeri signala i modulatora koji uzrokuju aktivaciju mikroglije. Preuzeto i prilagođeno iz (57).

Skupina signala i modulatora	Primjeri
Površinske strukture i DNA/RNA virusnog, bakterijskog ili gljivičnog porijekla	agonisti receptora koji prepoznaju uzorak (engl. <i>pattern recognition receptors – PRR</i> ), među kojima su najvažniji receptori TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR9: bakterijski LPS, proteoglikani staničnog zida i lipoteikoična kiselina (LTA), podjedinice ovojnice retrovirusa gp41 i gp120
Abnormalni endogeni proteini	agregati beta amiloida, A $\beta$ 25-35, A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, prionski proteini
Komplement	komponente sustava komplementa C1q, C5
Protutijela	imunoglobulini raznih klasa i izotipova (IgG, IgA, IgM) prezentiranih u obliku imunoloških kompleksa
Citokini	čimbenici stimulacije kolonija i citokini: M-CSF, GM-CSF, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ (engl. <i>tumor necrosis factor alpha</i> - čimbenik nekroze tumora alfa,) TGF- $\beta$ itd.
Kemokini	ligandi koji se vežu na kemokinske receptore: CCR3, CCR5, CXCR, CXCR2, CXCR4, CX3CR1, IL-8R
Neurotrofni čimbenici	neurotrofni čimbenik porijeklom iz mozga – BDNF, neurotrofni čimbenik porijeklom iz stanica glije – GDNF (engl. <i>glia derived neurotrophic factor</i> ), čimbenik rasta živaca – NGF (engl. <i>nerve growth factor</i> ), neurotrofini NT-3 i NT-4
Komponente krvne plazme	albumin, fibronektin, fibrinogen, trombin
Ostali proteini i peptidi	apolipoprotein E (ApoE), proteini toplinskog šoka HSP60, HSP70, CD40L, melanocitni stimulirajući hormon – MSH, endotelin, S100 proteini, vazoaktivni intestinalni peptid (VIP)
Spojevi povezani s prijenosom podražaja živčanim stanicama	ATP i srodni purini, $\beta$ -adrenergični agonisti, glutamat, kainat, NMDA
Ioni	ioni kalija i mangana
Ostali spojevi	kanabinoidi, ceramidi, gangliozi, lipofosfatidna kiselina (LPA), melanin, endogeni opijati (endomorfini), čimbenici aktivacije trombocita – PAF (engl. <i>platelet activating factor</i> ), prostaglandin E <sub>2</sub> , steroidni hormoni



Prema mehanizmu, aktivacija mikrogije može se odvijati na dva različita načina: a) aktivacijom stanica specifičnim ligandom koji u fiziološkim uvjetima nije prisutan u središnjem živčanom sustavu (npr. egzogeni lipopolisaharid G- bakterija, endogeni HSP70), ili se pak nalazi u nefiziološkom obliku (npr. proteinski agregati  $\beta$ -amiloida); i b) nedostatnom stimulacijom stanica mikrogije tzv. "umirujućim" signalima iz okoline. Prvi način uključuje bakterijske, virusne, gljivične, ali i endogene strukture koje se vežu na receptore koji prepoznaju uzorak (engl. *PRR – pattern recognition receptors*), a potom aktiviraju unutarstanični signalni put koji započinje upalnu reakciju ili ju pojačava. Receptori nalik na Toll - TLR, pripadaju skupini PRR receptora koji posreduju u ovom obliku aktivacije mikroglijalnih stanica i bili su predmet ovog istraživanja. U drugom slučaju, bilo kakav oblik narušavanja neuronalnog integriteta, neovisno o tipu ozljede može uzrokovati nedostatak "umirujućeg" signala iz okoline i posljedično aktivirati mikroglijalnu stanicu. Primjer takvih "umirujućih" signala su parovi ligand-receptor  $CX_3CL_1$ - $CX_3CR_1$ , CD200-CD200R itd. Pri tome je važno naglasiti kako umirujući signali nikako nisu inhibirajući, kao što je to primjerice učinak interleukina-10 ili TGF- $\beta$ , nego djeluju na stanicu mikrogije na način da ju drže na nižem stupnju aktivacije, a eventualni izostanak signala uzrokuje prijelaz stanice mikrogije u viši stupanj aktivacije. Putem ova dva mehanizma, stanice mikrogije sposobne su reagirati na poznate i nepoznate signale i modulare koji su prisutni u njihovoj neposrednoj okolini (57). Uz navedeno, važno je napomenuti kako neurotransmiteri također mogu imati "umirujući" učinak na mikroglijalne stanice, čemu u prilog ide i prisutnost brojnih vrsta receptora za neurotransmitere na površini stanica mikrogije (67). Aktivacija GABA i adrenergičnih receptora na površini stanica mikrogije može također imati protutupalni učinak (68).

Nakon otkrivanja patološkog događaja u svojoj okolini, stanice mikrogije stvaraju i otpuštaju brojne medijatore upale. Tijekom ishemije, stanice mikrogije otpuštaju proupalne citokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i dr.), kemokine (MCP-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*), MIP-1 $\alpha$  (engl. *monocyte inhibitory protein*)), te slobodne kisikove radikale koji dovode do naknadnih oštećenja, pojačanja upale i povećanja propusnosti krvno-moždane barijere. Uz proupalne molekule, mikrogija također izlučuje IL-10, TGF- $\beta$ , citokine koji smiruju nastalu upalnu reakciju, te čimbenike rasta koji sudjeluju u oporavku mozga nakon lezije, primjerice IGF-1.

Od rezidentnih stanica, osim stanica mikroglije, u upalnom odgovoru mozga na ishemijsku leziju sudjeluju i perivaskularni makrofazi koji se nalaze između bazalne membrane krvne žile i površine mozga (glije limitans superficialis). Iako je njihov broj vrlo malen, a funkcija nepotpuno razjašnjena, smatra se kako upravo citokini izlučeni od strane perivaskularnih makrofaga potiču infiltraciju upalnih stanica iz krvi prema oštećenom moždanom parenhimu (69).

Dendritičke stanice su specijalizirane stanice koje predočuju antigene (engl. *antigen presenting cells - APC*), a smatraju se posrednicima između prirodnog i stečenog imunološkog odgovora. U zdravom mozgu, dendritičke stanice su malobrojne, a nalaze se u moždanim ovojnicama, koroidnom spletu (lat. *plexus chorioideus*), te cerebrospinalnom likvoru. 24 sata nakon nastanka ishemijske ozljede, u mozgu je uočeno povećanje broja dendritičkih stanica i to pretežno u pograničnoj zoni ishemijske ozljede, u području u kojemu se također nalaze i limfociti T, koji su privučeni iz cirkulacije na mjesto ishemijskoga oštećenja. U kasnijim fazama odgovora na ishemijsko oštećenje dolazi do povećanja broja dendritičkih stanica i u središtu ishemijske lezije. U literaturi je opisano kako su stanice koje su uočene ranije, sa smještajem na periferiji ishemijske lezije, porijeklom rezidentne dendritičke stanice, a stanice uočene u kasnijim fazama upale, sa smještajem u središtu ishemijske lezije, porijeklom iz cirkulacije (70).

Ishemijsko oštećenje aktivira također i perivaskularne mastocite, čijom se degranulacijom otpuštaju vazoaktivni medijatori, poput histamina, TNF- $\alpha$ , proteaza (triptaze, kimaze, MMP2 MMP9 (MMP - metaloproteinaze matriksa)), te heparina, endogenog antikoagulansa. Navedeni medijatori upale pojačavaju izražaj adhezijskih molekula na površini endotelnih stanica, povećavaju propusnost krvno-moždane barijere, čime se pojačava infiltracija leukocita (neutrofila, limfocita i monocita) na mjesto ishemijske lezije (69, 71, 72). Uz navedeno, mastociti imaju sposobnost fagocitoze, te prezentiranja antigena na svojoj površini, što vjerojatno utječe i na modulaciju stečenog upalnog odgovora (73).

### **1.3.2. Uloga infiltrirajućih stanica u patofiziologiji ishemijskoga oštećenja mozga**

U akutnoj fazi odgovora na ishemijsko oštećenje (nakon nekoliko minuta do nekoliko sati), dolazi do otpuštanja brojnih medijatora upale (citokina i kemokina), te stvaranja reaktivnih

kisikovih radikala koji se otpuštaju iz oštećenih tkiva (74, 75). Moždana mikrocirkulacija reagira na otpuštene medijatore upale i slobodne kisikove radikale, što uzrokuje poremećaj funkcije krvno-moždane barijere, na način da joj se povećava permeabilnost. U isto vrijeme, medijatori upale uzrokuju pojačani izražaj adhezijskih molekula na površini endotelnih stanica krvnih žila mozga, a ujedno i na površini leukocita i trombocita (selektini, integrini i superporodica imunoglobulina), što potiče adheziju i transendotelnu migraciju leukocita iz cirkulacije prema mjestu ozljede (76, 77). Najznačajnije stanice koje infiltriraju moždani parenhim nakon nastanka ishemijske ozljede uključuju neutrofile (tijekom rane faze upalnog odgovora), te monocite i limfocite (u kasnijoj fazi).

Neutrofili su sekretorne i fagocitirajuće stanice prirodnog imunološkog sustava koje zbog moždane ishemije adheriraju uz endotelne stanice, procesom ekstravazacije izlaze van, te započinju migraciju prema ishemičnom području mozga (78). Od svih vrsta leukocita, neutrofili prvi infiltriraju ishemično područje mozga (unutar 30 minuta od nastanka ishemije), a njihov najveći broj uočen je unutar nekoliko sati nakon nastanka ishemije, nakon čega broj prisutnih neutrofila opada, te se uočava značajan porast broja prisutnih monocita/makrofaga (74, 77, 79). Uz navedeno, neutrofili također pridonose opsegu nastale upale na način da otpuštaju proinflamatorne molekule pohranjene u granulama i vezikulama (iNOS, NADPH oksidaza, mijeloperoksidaza, te enzimi matriks-metaloproteinaze), neposredno nakon što stupe u kontakt sa adhezijskim molekulama E-selektinima, koji su smješteni na luminalnoj površini endotelnih stanica (45, 80). Uz početnu degranulaciju na mjestu ozljede neurofili naknadno pridonose opsegu upale na način da proizvode i izlučuju velike količine slobodnih kisikovih radikala, proupalnih citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), kemokina (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , IL-8), elastaze, matriks-metaloproteinaze (uglavnom MMP-9), te dodatno pojačavaju izražaj adhezijskih molekula: integrina (npr. Mac-1) i selektina. Pretpostavlja se kako navedenim mehanizmima populacija neutrofila potiče upalni odgovor mozga na ishemijsku leziju, što može naknadno uzrokovati oštećenje živčanih stanica. Međutim, unatoč navedenom, uloga neutrofila u patofiziologiji ishemijskoga oštećenja mozga još uvijek nije razjašnjena, a često se smatra i marginalnom, budući da u literaturi postoje brojna istraživanja koja nisu prikazala jasnu poveznicu između broja prisutnih neutrofila i veličine nastale ishemijske lezije (54).

Nakon neutrofila, kroz otvorenu krvo-moždanu barijeru ekstravazacijom prolaze monociti kao odgovor na povećanu količinu novonastalih kemokina, kao što je primjerice MCP-1 (81 -

83). Temeljem prethodnih istraživanja, opisano je kako infiltracija makrofazima postaje evidentna nakon 12 do 24h nakon nastanka ishemijsko-reperfuzijske ozljede, a najizraženija je u periodu od 3 do 7 dana nakon nastanka oštećenja (83 - 85). Nakon ulaska u tkivo, monociti se transformiraju u makrofage, koje je morfološki i funkcionalno gotovo nemoguće razlikovati od aktiviranih stanica mikroglije. Naime, makrofazi porijeklom iz cirkulacije mogu imati vrlo razgranat oblik, nalik stanicama mikroglije, a stanice mikroglije svojom aktivacijom poprimaju fenotip fagocita, što ih čini vrlo sličnima makrofazima porijeklom iz cirkulacije. Veliki problem čini i nedostatak specifičnih staničnih biljega kojima bi se mogli razlikovati makrofazi od stanica mikroglije (54). Uporaba kimeričnog mišjeg modela u kojemu miševi sadrže koštanu srž koja je obilježena zelenim fluorescentnim proteinom (engl. *GFP – green fluorescent protein*) znatno je olakšala proučavanje dinamike infiltracije mozga monocitima/makrofazima nakon nastanka ishemijske ozljede (84, 86, 87). Uz navedene metode, opisano je i raspoznavanje staničnih populacija monocita/makrofaga metodom protočne citometrije pomoću biljega CD11b i CD45, što je korišteno u ovom istraživanju, a detaljnije je opisano sljedećim poglavljima (88, 89). Neovisno o porijeklu, makrofazi i aktivirane stanice mikroglije imaju važnu ulogu u uklanjanju neutrofila koji su infiltrirali ishemično tkivo mozga, kao i u uklanjanju nekrotičnih stanica. Naime, u literaturi je kao glavni put uklanjanja neutrofila i njihovih potencijalno citotoksičnih medijatora opisana upravo fagocitoza od strane aktiviranih stanica mikroglije i infiltrirajućih makrofaga. Uklanjanje apoptotičnih neutrofila i posljedično smanjenje količine izlučenih medijatora, pridonosi rezoluciji postishemijske upale, čime se umanjuje vjerojatnost kasnije egzacerbacije ishemijske ozljede (90 - 92). Osim navedene fagocitotske aktivnosti, stanice monocita/makrofaga proizvode i izlučuju razne medijatore upale, primjerice IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-23 i dr., koji imaju važnu ulogu u naknadnom pojačavanju postishemijske upalne reakcije (93).

Prilikom nastanka ishemijskoga oštećenja dolazi i do infiltracije limfocita u parenhim mozga uslijed otvaranja krvno-moždane barijere (94). Limfociti se ovisno o glikoproteinima prisutnim na površini stanica dijele na CD4<sup>+</sup> (pomagačke - T<sub>H</sub>; engl. *Helper*) i CD8<sup>+</sup> (citotoksične) limfocite T. Aktivacija stečenog upalnog odgovora započinje izlaganjem antigena na površini prezentirajućih stanica.

Prezentaciju antigena u uvjetima ishemijskoga oštećenja provode uglavnom dendritičke stanice i makrofazi, koji najprije prepoznaju antigen, a zatim ga razgrade do peptida, kojega

potom izlažu zajedno sa MHC-II molekulom (engl. *Major Histocompatibility Complex –II*) na površini predočne stanice (95). MHC-II – antigen kompleks je potom prepoznat od strane  $CD4^+$  limfocita koji na svojoj površini ima receptor TCR (engl. *T-Cell Receptor*), što uz prisutnost vezanja ko-stimulatornih molekula (primjerice CD28) rezultira aktivacijom pomagačkih  $CD4^+$  limfocita T. Nakon predočenja antigena,  $CD4^+$  limfociti T podliježu klonalnoj ekspanziji, procesu koji ovisi o autokrinoj stimulaciji s IL-2 (95).

Pomagački limfociti T dijele se nadalje na izvršne i regulatorne pomagačke limfocite T. Ovisno o signalima prisutnima u okolini, aktiviraju se različite subpopulacije pomagačkih limfocita, koji posljedično proizvode različite citokine. Primjerice, aktivacijom  $T_H1$  efektornih limfocita dolazi do pojačanog izlučivanja citokina IFN- $\gamma$  (interferon gama) i TNF- $\alpha$ , koji stimuliraju prirodni imunološki odgovor, te citotoksične limfocite T.  $T_H2$  efektorni limfociti T izlučuju brojne interleukine, te potiču humoralni imunološki odgovor.

Regulatorni limfociti T ( $T_{reg}$ ) ili supresorski limfociti T imaju imunosupresivan učinak, budući da pojačano izlučuju transformirajući čimbenik rasta - beta, te IL-10. Stoga, regulatorni limfociti T ključni su za održavanje homeostaze imunološkog sustava ograničavajući razoran učinak koji se javlja kao posljedica prekomjerne upalne reakcije, te na taj način djeluju neuroprotektivno.

Za razliku od  $CD4^+$  limfocita,  $CD8^+$  limfociti su citotoksični. Receptor TCR koji je prisutan na površini  $CD8^+$  limfocita T veže se na antigene prezentirane pomoću MHC-I molekule, koji su prisutni na svim stanicama. Nakon klonske ekspanzije, aktivirani  $CD8^+$  limfociti T kontroliraju stanice koje se nalaze u okolini, a ukoliko pronađu stanicu koja na svojoj površini ima izložen onaj antigen na koji su oni osjetljivi, stanica se uništava permeabilizacijom membrane pomoću perforina, uz što se inducira apoptoza aktivacijom kaspaza.

NK stanice su citotoksični limfociti koji na svojoj površini nemaju izražen receptor TCR, te im stoga za aktivaciju nije potrebna prethodna prezentacija antigena, već je dovoljna stimulacija interferonom ili drugim citokinima. NK stanice djeluju citotoksično na način da izlučuju velike količine interferona- $\gamma$ , IL-2 i TNF- $\alpha$ . (45, 96).

Unatoč dugom periodu istraživanja uloge limfocita u patofiziologiji ishemijskoga oštećenja mozga, još uvijek nije razjašnjeno utječu li limfociti na razvoj ishemijske lezije ili ne. Naime, postoje brojni suprotstavljeni dokazi koji govore u prilog hipotezi kako limfociti doprinose oštećenju tkiva u uvjetima ishemije, kao i dokazi koji govore u prilog tome da limfociti imaju neznatnu, odnosno nemaju značajnu ulogu u patofiziološkome slijedu događaja nakon nastanka ishemijskoga oštećenja (45). Međutim, opisan je nastanak protutijela na antigene prisutne u središnjem živčanom sustavu, kao što je primjerice MBP (engl. *myelin basic protein* – bazična bjelancevina mijelina) nakon preboljelog ishemijskog moždanog udara, što ukazuje kako je tijekom odgovora na ishemiju došlo do prezentacije antigena na predočnim stanicama i posljedične aktivacije limfocita (97). Nasuprot navedenome, uočena je jasna disocijacija između pojave povećanog broja prisutnih limfocita T (nakupljanje počinje 24 sata nakon nastanka ishemijske ozljede) i prezentacije antigena, kao i klonske ekspanzije, tj. stečenih odgovora koji se očekivano javljaju u kasnijim fazama odgovora na ishemijsko oštećenje (98). Uz navedene, postoje brojni drugi suprotstavljeni dokazi za i protiv uloge stečene imunosti u odgovoru mozga na ishemijsku leziju (45).

Uz nedovoljno razjašnjen krajnji učinak pojedinih podvrsta limfocita (djeluju li neuroprotektivno ili štetno), potrebno je naglasiti kako za sada nije poznat točan vremenski slijed kojim se pojedine podvrste limfocita javljaju u ishemičnom mozgu (54).

### **1.3.3. Uloga astrocita u patofiziologiji ishemijskoga oštećenja mozga**

U središnjem živčanom sustavu stanice glije mogu se podijeliti na mikrogliju i makrogliju. Makrogliju čine dvije osnovne skupine stanica, oligodendrociti i astrociti. Astrociti su najbrojnije glija stanice u mozgu, a prema smještaju i obliku dijele se na protoplazmatske astrocite i fibrilarne astrocite. Protoplazmatski astrociti smješteni su u sivoj tvari mozga, dok su fibrilarni astrociti smješteni u bijeloj tvari. Protoplazmatski astrociti su stanice sa vrlo velikim brojem staničnih nastavaka, koji se pružaju u svim smjerovima od tijela astrocita. Veliki broj nastavaka protoplazmatskih astrocita pruža se prema krvnim žilama, gdje astrociti nožicama prijanjaju uz stijenku krvnih žila, koje na taj način bivaju potpuno obavijene nožicama brojnih astrocita duž svog čitavog toka u mozgu (99, 100). S druge strane, astrociti pružaju nastavke koji prijanjaju uz neurone i ostvaruju izravan kontakt sa gotovo svim

sinapsama u svojoj okolini. U odgovoru mozga na ishemijsku leziju protoplazmatski astrociti imaju vrlo značajnu ulogu, izraženiju od fibrilarnih astrocita (64).

Prilikom nastupa ishemijskoga oštećenja mozga dolazi do poremećaja intermedijarnog metabolizma astrocita i neurona, što uzrokuje smanjenje protektivnog učinka astrocita na neurone. U skladu s navedenim, dolazi do ometanja zaštitnih procesa pohrane glutamata iz okoline u citoplazmu astrocita, puferiranja povišene koncentracije kalija prisutne u okolini, te eliminacije nastalih slobodnih kisikovih radikala (101). Prilikom odgovora na ishemijsko oštećenje dolazi do pojave tzv. reaktivne astroglioze, pojma koji označava zadebljanje (hipertrofiju) staničnih nastavaka uz pojačani izražaj intermedijarnih filamenata kao što su GFAP (*engl. glial fibrillary acidic protein* - glijalni kiseli nitasti protein) i vimentin, uz re-ekspresiju nestina, a mreža intermedijarnih filamenata postaje vrlo izražena, posebice u najvećim nastavcima astrocita, kao i u samoj somi astrocita. (102, 103).

Značajka astrocita je relativno velika otpornost na uvjete hipoksije. Stoga se smatra kako preživljavanje neurona u uvjetima ishemije traje onoliko dugo koliko traje i preživljavanje astrocita. Međutim, ta otpornost značajno opada u slučaju prisutne acidoze i visoke koncentracije kalijevih iona, koji se u uvjetima moždane ishemije javljaju kao posljedica nastalih periinfarktnih depolarizacija.

Osim potpore neuronima u akutnoj fazi nastanka moždane ishemije, uloga astrocita je posebno izražena u organizaciji nastalog moždanog oštećenja i u postishemijskom oporavku. Naime, astrociti u odgovoru na ishemijsku leziju proliferiraju, migriraju do ruba ishemijske lezije i sudjeluju u stvaranju glijalnog ožiljka (101). Stvoreni glijalni ožiljak izolira i štiti neoštećeno tkivo od ozljede, sprječava širenje upale i neizravno doprinosi kontroli sastava izvanstaničnog okoliša (104, 105). S druge strane, neki autori smatraju kako ožiljak stvara fizičku prepreku izrastanju neurita prema mjestu ishemijske lezije, a također pogoduje nastanku reaktivnih kisikovih radikala i medijatora upale koji posljedično uzrokuju daljnje oštećenje tkiva (104, 106 - 108). Osim navedenoga, u literaturi je opisano kako prilikom nastanka astroglioze vrlo važno mjesto zauzima postishemijska upala, čijom aktivacijom dolazi do oslobađanja medijatora upale koji uzrokuju aktivaciju astrocita i pojavu reaktivne astroglioze, kao što su TGF- $\beta$ , INF- $\gamma$ , interleukini, čimbenik rasta fibroblasta 2 (*engl. FGF-2–Fibroblast Growth Factor-2*), MCP-1 i drugi (109). Ukoliko dođe do značajnije promjene u

aktivaciji/opsegu postishemijske upale, mogu se pretpostaviti i promjene u aktivaciji astrocita, a možda čak i u stvaranju glijalnog ožiljka, što kasnije može imati ne/povoljan učinak na ograničavanje ishemijske lezije.

#### 1.4. Receptori nalik na Toll – TLR

Kao glavne rezidentne imunološke stanice u središnjem živčanom sustavu, stanice mikroglije čine prvu liniju obrane u borbi protiv egzogenih prijetnji kao što su virusi i bakterije. Glavni zadatak receptora koji prepoznaju uzorak - PRR prisutnih na površini mikroglijalnih stanica, je upravo otkrivanje mikroorganizama, aktiviranje stečenog imunološkog sustava i sudjelovanje u zajedničkim aktivnostima efektornih stanica (110, 111). PRR prepoznaju egzogene molekularne uzorke patogenih mikroorganizama (*PAMP* – engl. *Pathogen Associated Molecular Patterns*) te uključuju: (a) receptore nalik na Toll – TLR (engl. *Toll-like receptors*), (b) receptore nalik na NOD - NRL (engl. *NOD-like receptors*; *NOD – nucleotide binding and oligomerization domain*), (c) receptore koji sadrže domenu za RNA helikazu i dvije domene za aktiviranje kaspaza – CARD (engl. *Caspase Recruitment Domains*), poznate također pod nazivom RLR (engl. *Rig-I-like receptors*), te (d) receptore lektinskog tipa, manozne i beta-glukanske receptore (112 - 115).

Od navedenih skupina receptora, osim detekcije molekularnih uzoraka svojstvenih patogenim mikroorganizmima, članovi TLR porodice receptora imaju dvojak funkciju budući da prepoznaju i endogene molekule koje su stvorene, otpuštene ili modificirane uslijed ozljede tkiva. Ove molekule-signali su objedinjene zajedničkim nazivom - molekularni uzorci pridruženi ozljedi/opasnosti (*DAMP* – engl. *Danger/Damage Associated Molecular Patterns*), a poznati su i pod nazivom alarmini (116). Aktivacijom receptora TLR koji imaju sposobnost prepoznavanja PAMP i DAMP signala induciraju se garniture gena koje se preklapaju, a obje vrste signala na taj način zapravo daju informacije o narušenoj homeostazi i započinju prikladne reakcije koje su karakteristične za stanja u kojima je narušen integritet središnjeg živčanog sustava (117, 118).

Receptori nalik na Toll su porodica transmembranskih glikoproteinskih receptora bogatih ponavljajućim slijedovima leucina, a otkriveni su prvi puta u vinskoj mušici (*Drosophila*), gdje imaju važnu ulogu u dorzoventralnoj polarizaciji zametka vinske mušice (119). Naziv



"Toll" skovan je 1985. godine tijekom analize fenotipa zametka vinske mušice s mutiranim Toll genom kome je ventralna strana bila slabo razvijena, na što je Christiane Nüsslein-Volhard s Max Planck instituta u Tübingenu uzviknula "*Das war ja toll!*", njem. "Ovo je odlično!". Otkriće gena *Toll* bilo je jedno od najznačajnijih otkrića potrebnih za razumijevanje rane embriogeneze u to doba. 1995. godine Nüsslein-Volhard je dobila Nobelovu nagradu u području fiziologije ili medicine za otkrića u području genetske kontrole ranog embrionalnog razvoja (120). Daljnja istraživanja ukazala su na ključnu ulogu Toll proteina u imunološkom odgovoru *Drosophile* na gljivičnu infekciju *Aspergillus fumigatus* (121). Za navedeno otkriće je 2011. godine Jules A. Hoffmann dobio Nobelovu nagradu u području fiziologije ili medicine, za otkrića u području aktivacije prirođenog imunološkog odgovora. Nagradu je u isto vrijeme dobio i Bruce A. Beutler, koji je 1998. godine opisao kako mutacija na genu *Tlr4* u sisavaca uzrokuje poremećen odgovor na stimulaciju lipopolisaharidom (122). Ova dva otkrića opisala su molekularni senzorni sustav Toll/TLR koji je zajednički kukcima i sisavcima, a esencijalan je za aktivaciju prve linije obrane protiv patogenih mikroorganizama. Analogni receptor "nalik na Toll" u sisavaca prvi puta je kloniran 1997. godine (123), a trenutno je poznato 11 ljudskih i 13 mišjih podvrsta receptora nalik na Toll (124, 125).

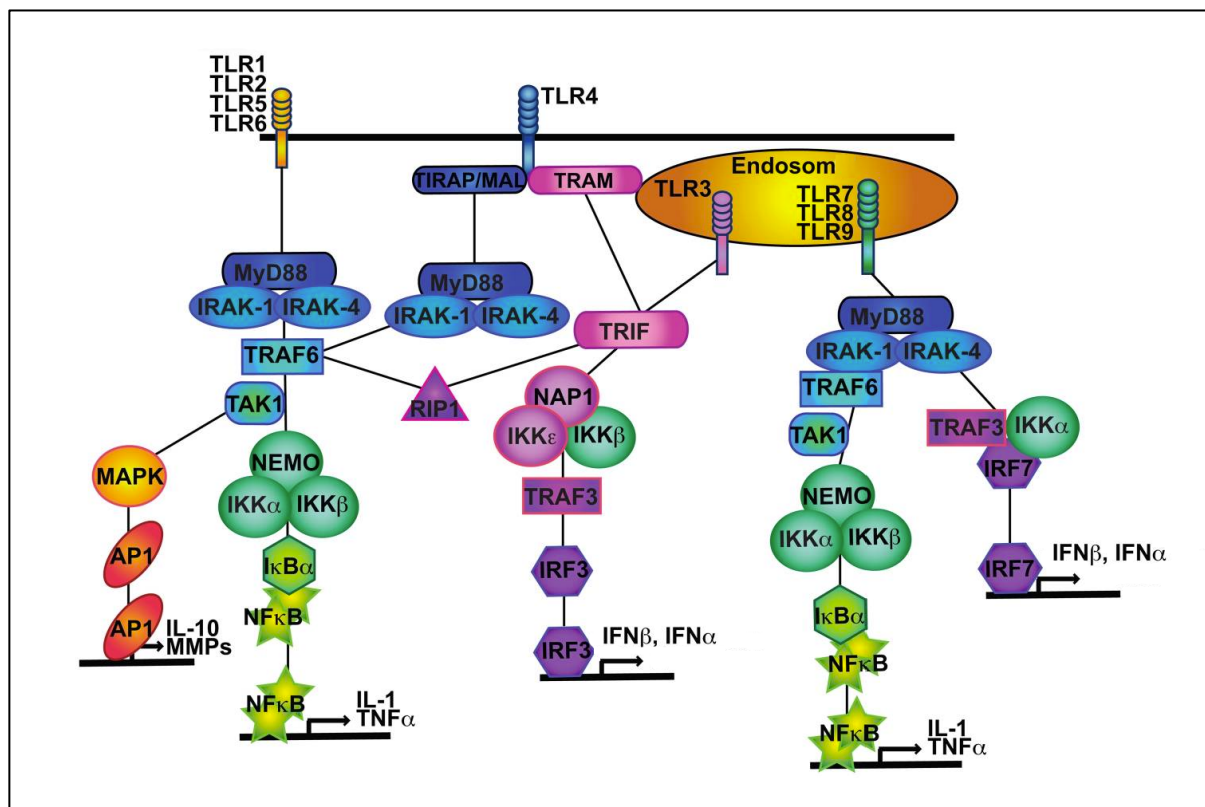
Receptori nalik na Toll esencijalni su za aktivaciju imunološkog odgovora na infekciju ili neki drugi oblik narušavanja funkcionalnog integriteta tkiva u kojemu se upalne stanice nalaze. Različiti TLR specifično vežu pojedine PAMP ili DAMP ligande, te aktiviraju unutarstanični signalni put. Definirani specifični ligandi za pojedine receptore TLR navedeni su u *Tablici 2*. Trenutno, za TLR-10 i TLR-11, još uvijek nisu otkriveni specifični ligandi.

*Tablica 2.* Prikaz receptora TLR za specifičnim DAMP i PAMP ligandima. Iz (126 -128).

<b>TLR</b>	<b>DAMP ligandi</b>	<b>Izvor</b>	<b>PAMP ligandi</b>
TLR 1			bakterijski triacil-lipopeptidi
TLR 2	Hsp60 Hsp70 Hsp90 (gp96) HMGB1	nekrotične stanice nekrotične stanice nekrotične stanice otpušten iz jezgre	lipoproteini/lipopeptidi lipoteikoična kiselina lipoarabinomanan peptidoglikan

<b>TLR 2 (nastavak)</b>	<b>DAMP ligandi</b>	<b>Izvor</b>	<b>PAMP ligandi</b>
	Biglikan Hijauronan fibronektin	iz ECM razgradnja velikih spojeva u ECM nekrotične stanice	glikoinozitolfosfolipidi glikolipidi atipični LPS
TLR 3	mRNA u kompleksu s lipofektinom	nekrotične stanice	dvolančana RNA
TLR 4	Hsp60 Hsp70 Hsp90 (gp96) HMGB1 Biglikan Hijauronan Fibronektin A fibrinogen Heparan sulfat LDL Alfa-A-kristalin	nekrotične stanice nekrotične stanice nekrotične stanice otpušten iz jezgre iz ECM razgradnja velikih spojeva u ECM oštećeno tkivo ekstravazacija zbog povlačenja endotelnih stanica iz ECM i staničnih membrana proinflamatorni i proaterogeni proteini nekrotične stanice	LPS G- bakterija fuzijska bjelančevina respiratornog sincicijskog virusa
TLR 5			flagelin
TLR 6			diacil lipopeptidi lipoteikoična kiselina zimosan
TLR 7	RNA imuno-kompleks siRNA u liposomima	nekrotične stanice nekrotične stanice	imidazokinolin (lijek) bropirimine (lijek) jednolančana RNA
TLR 8	siRNA u liposomima	nekrotične stanice	jednolančana RNA
TLR 9	kromatinski imuno- kompleks DNA imuno-kompleks	nekrotične stanice nekrotične stanice	nemetilirani CpG ODN

Prema lokalizaciji, TLR-1, -2, -4, -5 i -6 smješteni su na staničnoj površini, dok su TLR-3, -7, -8, i -9 pridruženi endosomalnim odjeljcima (Slika 3). TLR povezani su s obitelji IL-1-receptora preko homologne Toll/IL-1R (TIR) domene koja sadrži MyD88, molekulu prilagođivač (129, 130). Stimulacijom TLR aktivira se zajednički unutarstanični signalni put koji uključuje udruživanje TIR domene sa MyD88 prilagođivačkom bjelančevinom (svi osim TLR-3).



Slika 3. Unutarstanični Myd88-ovisni i MyD88-neovisni signalni put porodice TLR receptora. Preuzeto i prilagođeno iz (126).

Posljedično se aktivira fosforilacijska kaskada koja uključuje interleukin-1 receptor-udruženu kinazu 1, 2 i 4 (engl. *IRAK-1, -2, -4 – IL-1 Receptor-Associated Kinase*). Nakon auto- i kros-fosforilacije IRAK1, 2 i 4, IRAK kompleks disocira od Myd88 prilagođivačke molekule i veže se za TNF receptor-pridruženi faktor 6 ligazu - TRAF6 (engl. *TNF Receptor Associated Factor 6*). Potom, TRAF6 aktivira TAK1 koji aktivira IKK (engl. *IκB kinase*) kompleks i MAP kinaze (engl. *MAPK – mitogen-activated protein kinase*). IKK kompleks se sastoji od

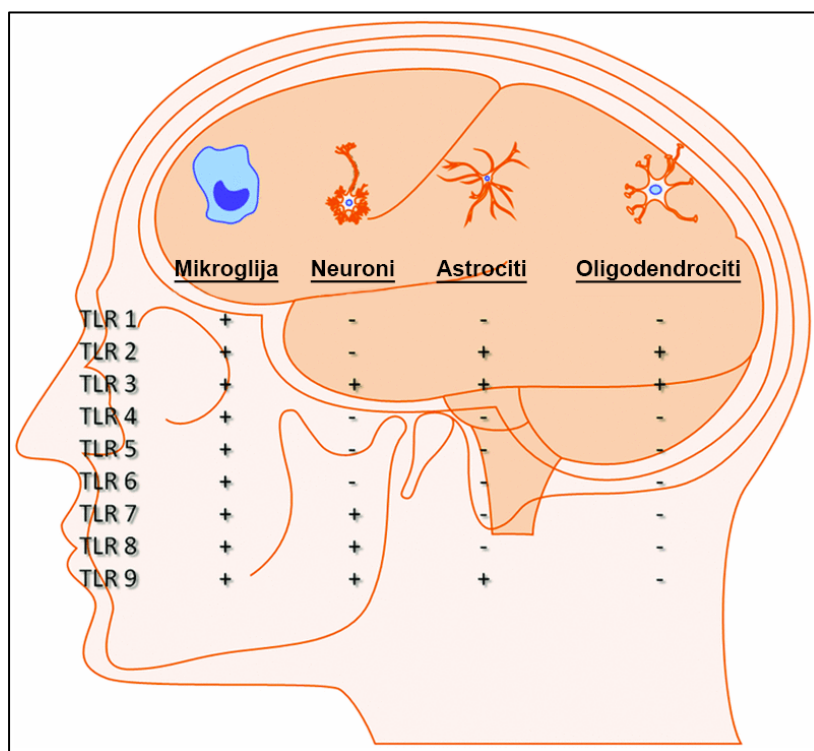
IKK $\alpha$  i IKK $\beta$  i regulatorne podjedinice IKK $\gamma$ /NEMO (engl. *NF- $\kappa$ B essential modulator*) te fosforilira I $\kappa$ B protein. Navedeni korak fosforilacije potreban je za ubikvitinaciju i proteosomsku degradaciju I $\kappa$ B proteina, te nuklearnu translokaciju regulatora prepisivanja NF- $\kappa$ B, što rezultira pojačanom sintezom proupalnih citokina IL-1 i TNF- $\alpha$ . Članovi obitelji MAP kinaza fosforiliraju i aktiviraju komponente čimbenika prepisivanja AP-1 (engl. *activator protein-1*), što rezultira pojačanom sintezom interleukina-10 (126, 131 - 134). Zajedno, ovi transkripcijski faktori induciraju pojačano stvaranje proupalnih citokina, što dalje pojačava upalu u tkivu na način da dolazi do dodatnog oštećenja stanica, stvaranja novih DAMP signala, a cijela kaskada se ponovno aktivira.

Endosomski TLR receptori (TLR-7, -8 i -9) također u svom unutarstaničnom signalnom putu uključuju MyD88 prilagođivačku bjelančevinu, te članove IRAK obitelji. Budući da su navedeni receptori smješteni u endosomima, fosforilirani IRAK kompleks regrutira TRAF3 umjesto TRAF6 ligaze. Aktivacija TRAF3 dovodi do fosforilacije, dimerizacije i nuklearne lokalizacije transkripcijskih faktora IRF3, IRF5 i IRF7 što posljedično rezultira pojačanom proizvodnjom IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$ . Stoga, aktivacija endosomskih receptora TLR-7, -8 i -9 rezultira aktivacijom NF- $\kappa$ B, AP-1 i IRF transkripcijskih čimbenika, što rezultira raznovrsnim genetskim odgovorom. Navedeni unutarstanični signalni put opisan za membranske TLR-1, -2, -5 i -6, te endosomske TLR-7, -8 i -9 naziva se MyD88-ovisnim putem.

Endosomski TLR-3 je jedinstven po svojstvu što u unutarstaničnom signalnom putu ne uključuje MyD88 prilagođivačku bjelančevinu, već uključuje TRIF (engl. *TIR domain-containing adaptor-inducing interferon  $\beta$* ) prilagođivačku molekulu. TRIF posljedično angažira TRAF6 i RIP-1, što rezultira s aktivacijom MAP kinaza i IKK $\alpha$ / $\beta$  kompleks. TLR-3 je sposoban, kao i ostali endosomski receptori TLR, aktivirati NF- $\kappa$ B, AP-1 i IRF transkripcijske čimbenike, iako ne uključuje MyD88 u svom unutarstaničnom signalnom putu. Navedeni unutarstanični signalni put naziva se MyD88-neovisnim putem.

Od svih receptora porodice TLR, jedino aktivacijom receptora TLR-4 unutarstanični signalni put može biti aktiviran na oba načina, tj. može se odvijati putem MyD88-ovisnog i Myd88-neovisnog signalnog puta.

U živčanom sustavu, receptori TLR raznoliko su izraženi, a opisana je prisutnost na stanicama glije (mikroglija, astrociti, oligodendrociti), na živčanim stanicama (111), kao i na neuroprogenitornim stanicama (135). Prisutnost pojedinih članova porodice receptora TLR po glavnim staničnim populacijama prisutnim u središnjem živčanom usutavu prikazani su na *Slici 4*.




---

*Slika 4.* Izražaj porodice receptora TLR u glavnim staničnim populacijama središnjeg živčanog sustava. Dok su na stanicama mikroglije izražene sve podvrste receptora TLR, na ostalim staničnim populacijama opisana je prisutnost samo određenih podvrsta receptora. Preuzeto i prilagođeno iz (136).

---

Stanice mikroglije konstitutivno izražavaju sve podvrste receptora TLR, što im omogućava prepoznavanje širokog spektra liganada, te aktivaciju upalnog odgovora. Populacija astrocita posjeduje tek nekoliko podvrsta receptora TLR: TLR2, TLR3 i TLR9. TLR2 receptori na površini astrocita sudjeluju u prepoznavanju PAMP liganada, primjerice intaktne bakterije *S.*

*aureus* ili peptidoglikana, komponente vanjske plazma membrane bakterija (137, 138). Uloga TLR3 na astrocitima bila je udružena sa istovremenim izražajem neuroprotektivnih medijatora, pa se smatra kako TLR3 na astrocitima sudjeluje u reparatnim mehanizmima staničnog rasta, migracije i diferencijacije (139). Također je opisana uloga TLR9 u odgovoru na PAMP ligand CpG ODN (citozin-fosfo-guanin oligodeoksinukleotid), nukleotidni slijed koji je vrlo zastupljen u bakterijskom genomu. Važno je napomenuti kako su uloge TLR-2, -3 i -9 opisane samo na primarnim staničnim kulturama astrocita, dok su podaci *in vivo* još uvijek manjkavi. U populaciji oligodendrocita opisana je prisutnost receptora TLR2 i TLR3. Pretpostavlja se kako imaju ulogu u reparatnim procesima nakon ozljede, primjerice u remijelinizaciji nakon ozljede kralježnične moždine (140). Neuronima izražavaju podvrste TLR koje se nalaze u endosomalnim odjeljcima, TLR3, 7, 8 i 9 (136). Uz navedene receptore, u literaturi je opisan izražaj TLR2 i TLR4 na populaciji živčanih stanica. U uvjetima ishemije opisana je indukcija TLR2 i nešto slabija indukcija TLR4 na neuronima u najranijoj fazi odgovora na ishemijsku ozljedu (jedan sat nakon nastanka lezije). Ubrzo, već nekoliko sati nakon ozljede, izražaj TLR2 više nije bio vidljiv na populaciji neurona, dok je indukcija TLR2 signala bila jasno izražena na populaciji stanica mikroglije. Zanimljivo, izražaj TLR4 na populaciji živčanih stanica uočen je i u kasnijim fazama nakon ishemijske ozljede (141).

Izvan središnjeg živčanog sustava, pojedini receptori TLR prisutni su na površini raznih podvrsta upalnih stanica, što nam govori kako receptori TLR najvjerojatnije imaju široku ulogu u aktivaciji i modulaciji prirodnog, ali i stečenog upalnog odgovora. (Tablica 3).

Tablica 3. Izražaj receptora TLR na pojedinim vrstama upalnih stanica. Preuzeto i prilagođeno iz (142).

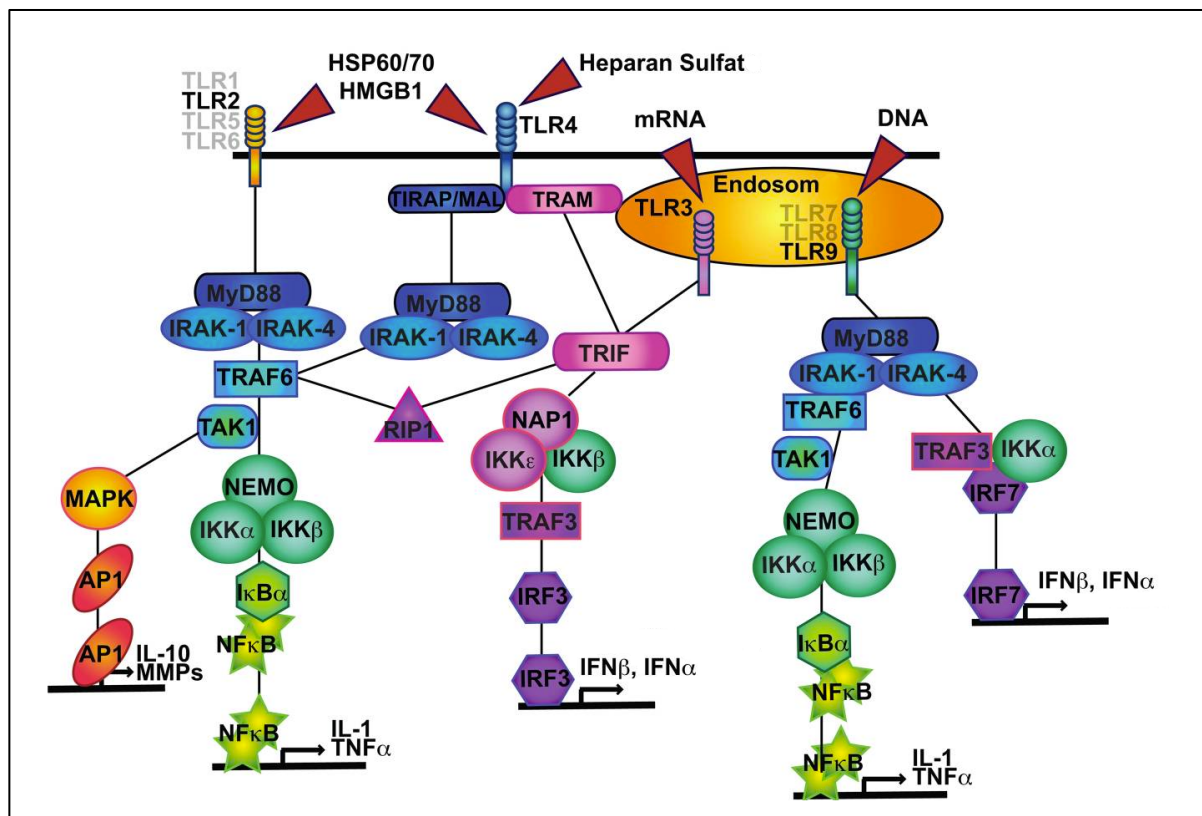
TLR	Izražaj na:	TLR	Izražaj na:
TLR1	monociti/makrofazi dendritičke stanice limfociti B	TLR7	monociti/makrofazi dendritičke stanice limfociti B
TLR2	monociti/makrofazi dendritičke stanice mastociti	TLR8	monociti/makrofazi dendritičke stanice mastociti

TLR3	dendritičke stanice limfociti B	TLR9	monociti/makrofazi dendritičke stanice limfociti B
TLR4	monociti/makrofazi dendritičke stanice mastociti	TLR10	monociti/makrofazi limfociti B
TLR5	monociti/makrofazi dendritičke stanice	TLR11	monociti/makrofazi
TLR6	monociti/makrofazi mastociti limfociti B		

Brojna istraživanja ukazala su na važnost receptora TLR u raznim bolestima središnjeg živčanog sustava, uključujući infekcije, traumatske ozljede, neurodegenerativne bolesti, ishemijski moždani udar i autoimune bolesti (143 - 148). U središnjem živčanom sustavu stimulacija pojedinih TLR receptora njihovim specifičnim ligandima uzrokuje aktivaciju mikroglialnih stanica, te potiče izlučivanje citokina i kemokina, ovisno o vrsti stimulusa i TLR receptoru koji je stimuliran (149, 125).

### 1.5. Receptori TLR2 u ishemijskoj ozljedi mozga

Postishemijski upalni odgovor započinje u trenutku kada stanice mikroglije prepoznaju molekule koje se oslobađaju kao posljedica oštećenja stanica, a koje imaju ulogu signala koji upozorava na patološko zbivanje prisutno u okolini mikroglialne stanice. Naime, uslijed nastalog ishemijskog oštećenja dolazi do stvaranja endogenih - DAMP liganada: HSP60, HSP70, HMGB1 (*engl. high-mobility group protein B1*) i staničnog fibronektina. Navedeni ligandi, koji ukazuju na narušeni strukturni integritet središnjeg živčanog sustava, vežu se na receptore TLR i započinju upalni odgovor, kao jednu od komponenti prethodno opisane patofiziološke kaskade događaja u odgovoru mozga na ishemijsku leziju (*Slika 5*) (150).



Slika 5. Ishemijsko oštećenje mozga aktivira TLR signalni put. DAMP signali oslobođeni uslijed ishemijskoga oštećenja vežu se na specifične TLR receptore – najizraženiji je učinak na TLR2 i TLR4 receptorima; posljedično dolazi do aktivacije unutarstaničnog signalnog puta i pojačane proizvodnje proupalnih citokina. Preuzeto i prilagođeno iz (126).

Odgovor mozga na ishemiju karakteriziran je pojavom tzv. "reaktivne mikroglioze" (engl. *reactive microgliosis*, pojava koji podrazumijeva aktivaciju i proliferaciju stanica mikroglije) koja je udružena sa pojačanim izražajem receptora TLR (151 - 153). Stimulacijom navedenih receptora endogenim DAMP ligandima dolazi do aktivacije unutarstaničnog signalnog puta, što posljedično rezultira pojačanim stvaranjem i otpuštanjem proupalnih medijatora kao to su IL-1β, Il-6 i TNFα.

U porodici TLR receptora, najizraženiji je porast izražaja receptora TLR2 nakon izazivanja ishemijskog oštećenja (152 - 154). Uz TLR2, dolazi također i do nešto slabije indukcije receptora TLR4 i TLR9 (126, 153).

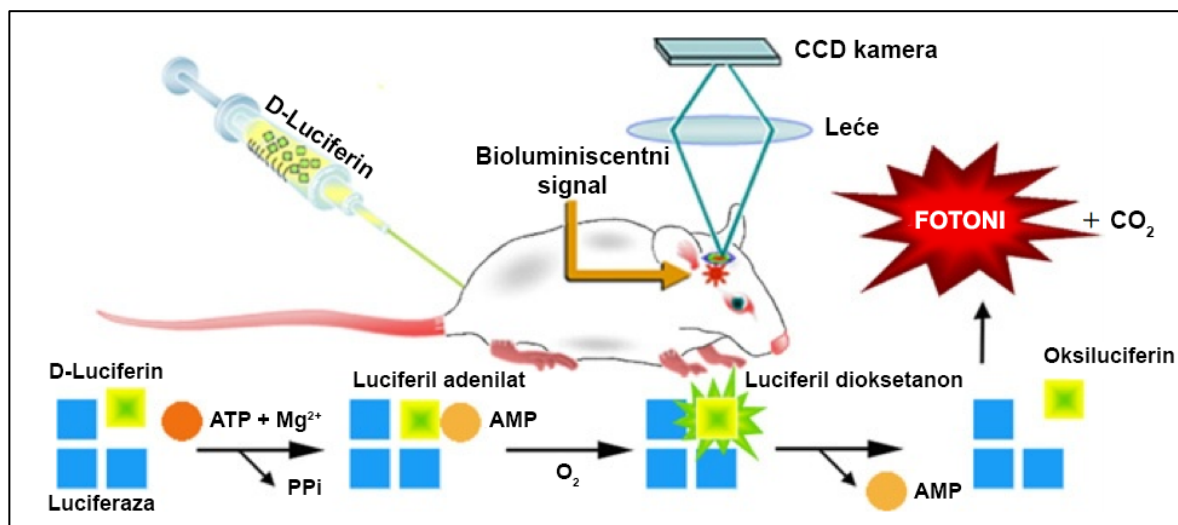


U miševa s onemogućenim *Tlr4* genom koji su bili podvrgnuti privremenoj ili trajnoj fokalnoj ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi mozga uočeno je smanjenje volumena ishemijske lezije u odnosu na miševe divljeg tipa (141, 144, 154, 155). U odnosu na *Tlr4*, u miševa s onemogućenim *Tlr2* genom istraživanja nisu pokazala konzistentne rezultate nakon privremene ishemijsko-reperfuzijske ozljede mozga. Naime, u literaturi je zabilježeno smanjenje lezije (141, 152, 153), ali i povećanje lezije (154) u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom, u odnosu na miševe divljeg tipa 1, 2, i 3 dana nakon izazivanja ishemijskog oštećenja.

Do sada, prema raspoloživoj literaturi, nije proučavana kasnija faza odgovora mozga na ishemijsku leziju. Na temelju takvog istraživanja moglo bi se uspješno prikazati dinamiku razvoja ishemijske lezije, te eventualnu ovisnost razvoja ishemijske lezije o funkcionalnom TLR2 receptoru. Dodatni pokusi koji će razjasniti ulogu TLR2 u odgovoru mozga na ishemijsku leziju bili su nužni, a provedeni su u ovom istraživanju kako bi se razjasnilo djeluje li modulacija postishemijskog upalnog odgovora putem TLR2 receptora na koristan način (posljedica je manja ishemijska lezija kao i neurološki deficit) ili pak djeluje štetno (povećava nastalu ishemijsku leziju i pogoršava neurološki status).

#### **1.6. *In vivo* oslikavanje transkripcijske aktivacije *Tlr2* mjerenjem bioluminiscencije**

Odgovor mozga na ishemijsko oštećenje karakteriziran je kompleksnim slijedom patofizioloških procesa, koji traju tijekom dugog perioda nakon nastanka ishemijske lezije (4). Mnogobrojni geni postaju aktivni i induciraju postishemijski upalni odgovor, kao i oporavak mozga nakon ishemijske lezije. Do danas, točna vremenska i prostorna komponenta takvog odgovora nisu u potpunosti razjašnjene. Kako bi se što preciznije proučila obilježja odgovora mozga na ishemijsko oštećenje u živom mišu, razvijeno je i validirano nekoliko transgeničnih mišjih modela bioluminiscencije i fluorescencije, koji omogućavaju neinvazivno praćenje procesa neuroinflamacije, neuronalnog oštećenja, stresa neurona, te procesa oporavka nakon ishemijske lezije, i to iste životinje u više vremenskih točki, tj. tijekom dužeg vremenskog perioda (156). Bioluminiscencija je oblik kemoluminiscencije u kojoj se kao rezultat kemijske reakcije oslobađa energija u obliku svjetlosti. Ovu svjetlost moguće je zabilježiti pomoću vrlo osjetljive CCD (engl. *charge coupled device* – nabojem spregnuti sklop) kamere visoke razlučivosti (*Slika 6*).



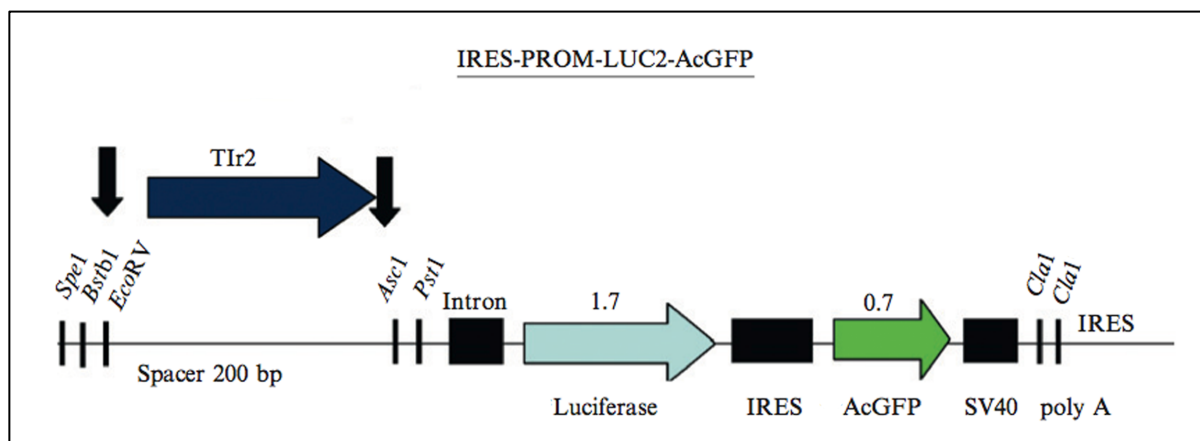
Slika 6. Shematski prikaz detekcije izvora bioluminiscencije koji se nalazi u mozgu živoga miša. U prisutnosti ATP-a i magnezija, luciferin se veže na luciferazu. Posljedično, dolazi do cijepanja ATP-a i oslobađanja pirofosfata (PPi) i stvaranja AMP-a, a stvara se luciferil adenilat. Luciferil adenilat oksidira u nestabilni molekularni oblik nakon nekoliko međukoraka. Kako bi nastali nestabilni oblik postigao svoju stabilnost, oslobađa se energija u obliku fotona, koji se bilježi CCD kamerom. Preuzeto i prilagođeno iz (156).

Luciferaza dobivena iz krijesnice koristi se u mnogim primjenama, posebice u genetskom inženjeringu, gdje služe kao reporterski geni (157 - 159). U posljednje vrijeme biofotonski/bioluminiscentni signali iz živih životinja korišteni su kao biomarkeri u nekoliko namjena: za vizualizaciju aktivnih patoloških događaja nakon ishemijskoga oštećenja (160 - 162); za provođenje testa probira za nove biokompatibilne molekule (163, 164); te za analizu patogenih procesa u ranoj fazi kao i za praćenje učinkovitosti terapije u kroničnim neurološkim poremećajima (165 - 167).

Kao što je u prethodnim odjeljcima navedeno, aktivirane stanice mikroglije su glavne izvršne stanice prirodnog imunološkog sustava u mozgu nakon nastupa ishemijskoga oštećenja. Aktivacija mikroglijalnih stanica udružena je sa znatnom indukcijom transmembranskog receptora TLR2. Korištenjem navedenih svojstava bioluminiscencije, u Laboratoriju Zavoda za psihijatriju i neuroznanost Istraživačkog centra Sveučilišta Laval u Quebecu, u kojemu je proveden dio istraživanja prikazanog u ovoj disertaciji, stvorena je transgenična mišja linija

koja sadrži dvostruki-bicistronski reporterski sustav: luciferazu (*Fluc* – engl. *Firefly luciferase* – luciferaza dobivena iz krijesnice) i GFP, čije prepisivanje ovisi o promotoru *Tlr2* gena (*Slika 7*) (162).

Kao što je opisano u poglavlju udžbenika *Methods in Enzymology* (156), transgenična mišja linija generirana je na način da je fragment u duljini od 1548 bp (bp – engl. *base pairs* – parovi baza) koji pripada mišjem *Tlr2* promotoru, umnožen metodom lančane reakcije polimerazom (PCR). Fragmenti umnoženi na takav način umetnuti su u IRES vektor, koji je prethodno dvostruko cijepan s restriksijskim endonukleazama s ciljem uklanjanja neposrednog ranog promotora citomegalovirusa (PCMV<sub>IE</sub>). Potom, fragment duljine 1,7 kb koji odgovara reporterskom genu za luciferazu (*luc2*) iz pGL4 vektora (Promega) i fragment duljine 0,7 kb koji odgovara reporterskom genu za zeleni fluorescentni protein AcGFP (kratica za *Aequorea coerulea* GFP) iz pAcGFP1 vektora (BD Biosciences) umetnuti su u IRES rekombinantni vektor. *Tlr2* promotor-luciferaza-AcGFP transgeni su zatim izolirani kao 5,2 kb dugački fragmenti IRES-TLR2-LUC2-AcGFP-p(A) konstrukta (*Slika 7*), nakon čega su mikroinjekcijom injicirani u muški pronukleus oplođene C57BL/6 oocite.



*Slika 7.* Shematski prikaz DNA konstrukta korištenog za generiranje TLR2-luc-gfp transgenične mišje linije. Preuzeto i prilagođeno iz (156).

Uzorak izražaja luciferaze u odrasлом mišu provjeren je na način da je nakon injekcije lipopolisaharida (LPS) mjerena intenzitet bioluminiscentnog signala, dok je na mikroskopskoj

razini identificirana indukcija transgena u stanicama mikroglije pomoću imunofluorescentne analize sa dva protutijela, anti-GFP i anti-Iba1 (biljeg stanica mikroglije).

Primjer primjene navedenog mišjeg modela prikazan je u istraživanju (162), gdje je korištenjem navedenog mišjeg modela uočeno kako postishemijski upalni odgovor ima izraženu kroničnu komponentu nakon nastanka početnog oštećenja. Krivulja TLR2 odgovora mjenog pomoću sustava IVIS (engl. *in vivo imaging system*) i *LivingImage* programa za analizu, pokazuje najjači izražaj 2 dana nakon izazivanja ishemijske lezije, a sam odgovor traje 3 mjeseca, koliko je trajalo mjerenje od trenutka nastanka oštećenja. Uz navedeno, prostorni izražaj TLR2 pokazao je dva mjesta na kojima je uočena indukcija TLR2. Najprije (unutar 6 sati od nastanka ishemijskog oštećenja) je uočena indukcija signala u području olfaktornih bulbosa, koja je trajala kroz cijeli period praćenja od 3 mjeseca, nakon čega je, očekivano, unutar 12 sati od nastanka ishemijske lezije, uočena indukcija signala u području ishemijske lezije. Indukcija signala u području olfaktornih bulbosa ukazuje na funkcionalno različitu populaciju stanica budući da reagira i na ishemijsku i na administraciju bakterijskog lipopolisaharida. Budući da se ove stanice nalaze između vanjskog svijeta i mozga, ova regionalno specifična populacija stanica najvjerojatnije se nalazi u višem stanju pripravnosti, te ima nešto niži prag aktivacije (162).

Prikazana krivulja indukcije TLR2 ukazala nam je na kroničnu komponentu izražaja TLR2. Budući da su prethodno navedena istraživanja proučavala ulogu receptora TLR2 isključivo u ranoj fazi odgovora na ishemijsku leziju, neophodno je provesti istraživanja i u kasnijim vremenskim točkama tijekom odgovora mozga na ishemijsko oštećenje.

## **2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA**

### **HIPOTEZA:**

Hipoteza ovog istraživanja je da receptori TLR2 sudjeluju u odgovoru mozga na ishemijsko oštećenje, te da imaju izražen zaštitni utjecaj, kako u akutnoj, tako i u kroničnoj fazi odgovora.

### **OPĆI CILJ:**

Opći cilj ovog rada je razjasniti ulogu receptora TLR2 kao sastavnog dijela prirođenog upalnog odgovora u događajima koji slijede nakon ishemijske ozljede mozga, a uključuju procese koji mogu biti zaštitni, odnosno pogubni za neurone.

### **SPECIFIČNI CILJEVI:**

1. Opisati vremensku i prostornu izraženost receptora TLR2 na stanicama mikroglije nakon ishemijskoga oštećenja mozga;
2. Opisati morfologiju stanica mikroglije i izvesti zaključak o stupnju aktivacije mikroglije na miševima divljeg tipa i miševima s onemogućenim *Tlr2* genom u akutnoj i kroničnoj fazi nakon ishemijske ozljede;
3. Usporediti broj i stupanj proliferacije stanica mikroglije i broj infiltrirajućih monocita/makrofaga, te limfocita u skupini miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom i skupini miševa divljeg tipa;
4. Usporediti veličinu ishemijske lezije, te stupanj neurološkog oštećenja u miševa divljeg tipa i miševa s onemogućenim *Tlr2* genom, te zaključiti pridonose li receptori TLR2 ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi ili štite tkivo od iste;
5. Istražiti učinak TLR2 receptora na apoptotično odumiranje stanica nakon ishemijske ozljede mozga.

### **3. UZORCI I POSTUPCI**

#### **3.1. Pokusne životinje**

Eksperimentalni postupci provedeni su na 2 do 4 mjeseca starim muškim miševima, na 4 soja miševa: (1) s onemogućenim *Tlr2* genom – *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševima, (2) na miševima divljeg tipa C57Bl/6 – *WT* miševima (engl. *Wild Type* – *WT*), te na transgeničnim miševima sa dvostrukim-bicistronskim reporterskim sustavom sa i bez funkcionalnog *Gal-3* gena: tj. na (3) *Tlr2/luc/gfp Gal-3*<sup>WT</sup> i (4) *Tlr2/luc/gfp Gal-3*<sup>-/-</sup> miševima. *TLR2*<sup>-/-</sup> i *WT* miševi pribavljeni su iz komercijalnog uzgoja životinja Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine). Transgenična mišja linija *Tlr2/luc/gfp* generirana je na Platformi za generiranje transgeničnih miševa u sklopu Istraživačkog centra Kliničkog bolničkog centra Sveučilišta Laval (CHUL). *Gal3*<sup>-/-</sup> miševi pribavljeni su iz NIH – podržanog konzorcija za funkcionalnu glikemiku ([www.functionalglycomis.org](http://www.functionalglycomis.org)) (engl. NIH – *National Institutes of Health*, Bethesda, SAD), a potom su spareni sa *Tlr2-luc-gfp* miševima kako bi se generirala *Tlr2/luc/gfp Gal-3*<sup>-/-</sup> mišja linija.

Svi postupci izvedeni za ovaj doktorat odobreni su od Etičkog povjerenstva Sveučilišta u Zagrebu, Medicinski fakultet, i u skladu su s naputcima Etičkog kodeksa Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama, koji je usklađen sa naputcima Međunarodnog vijeća za znanost o pokusnim životinjama (*International Council for Laboratory Animal Science*). Također, istraživanje je izvedeno u skladu s odredbama Zakona o zaštiti životinja (NN 135/06) i čl. 9 Pravilnika o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa (NN 176/04).

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

### 3.2. Genotipizacija miševa

DNA je dobivena iz bioptata uha (engl. *ear punch*), prikupljenog tijekom obilježavanja miševa oznakama (rupicama) na ušima, prilikom razvrstavanja u kaveze. Uzorak tkiva uronjen je u 300 µl pufera za razgradnju bioptata uha (engl. *ear punch buffer*) (priprema: 500 µl 10M NaOH, 100 µl EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina), do 500 ml ultra čista voda). Uzorci su u navedenom puferu inkubirani 2 sata na 95 °C, a potom čuvani na +4 °C do izvođenja genotipizacije. Uzorci pripremljeni na ovakav način sadrže DNA koja je korištena tijekom genotipizacije.

Genotipizacija miševa učinjena je metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chained Reaction – PCR*). Specifičnost metode je da se odabrani odsječci DNA umnažaju u vrlo velikom broju kopija. Za umnažanje je korištena DNA iz bioptata uha. Reakcijska smjesa za jedan uzorak sadržavala je:

- 2 µl DNA
- 2,20 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1 µl 20 mM početnica 1
- 1 µl 20 mM početnica 2
- 0,5 µl 25 mM dNTP
- 2,5 µl 10X PCR pufer za DNA polimerazu (Applied Biosystems)
- 0,30 µl 5 U/µl Taq DNA polimeraze (Applied Biosystems)

Početnice korištene za genotipizaciju miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom bile su 5'-TGGTTCTTTTCCCAAAGTGG-3' i 5'-CAATGGGAATCCTGCTCACT-3' za normalan (*WT*) alel; i 5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC-3' i 5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3' za *Neo* alel (gen za neomicinsku rezistenciju prisutan u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom).

Početnice za genotipizaciju transgeničnih mišjih linija kojima se detektirala prisutnost reporterskog gena za luciferazu bile su: početnica JK3: 5'-GGCGCAGTAGGCAAGG TGGT-3' i JK4: 5'-CAGCAGGATGCTCTCCAGTCC-3'.

Početnice korištene za genotipizaciju miševa sa onemogućenim *Gal-3* genom bile su 5'-AGGGCCAGTCCCTTAACAA-3' i 5'-GGGCACATCCTCTCATTGT-3' za normalan (*WT*) alel, te 5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC-3' i 5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3' za *Neo* alel (gen za neomicinsku rezistenciju prisutan u miševa sa onemogućenim *Gal-3* genom).

Ukupan volumen reakcijske smjese bio je 25  $\mu$ l.

Reakcija se odvijala u laboratorijskom uređaju za PCR (Eppendorf Mastercycler), pod sljedećim uvjetima:

Tlr2 WT alel: početna denaturacija (2 minute na 94 °C), nakon toga 30 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije (30 sekundi na 94 °C), ljepljenja početnica (30 sekundi na 58 °C) i produljivanja lanaca (45 sekundi na 72 °C), te završne polimerizacije nedovršenih lanaca DNA (5 minuta na 72 °C);

Neo alel: početna denaturacija (2 minute na 94 °C), nakon toga 30 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije (30 sekundi na 94 °C), ljepljenja početnica (30 sekundi na 61 °C) i produljivanja lanaca (45 sekundi na 72 °C), te završne polimerizacije nedovršenih lanaca DNA (5 minuta na 72 °C).

alel za luciferazu: početna denaturacija (15 minuta na 95 °C), nakon toga 30 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije (30 sekundi na 94 °C), ljepljenja početnica (30 sekundi na 65 °C) i produljivanja lanaca (60 sekundi na 72 °C), te završne polimerizacije nedovršenih lanaca DNA (7 minuta na 72 °C).

Gal-3 WT i Neo aleli: početna denaturacija (5 minute na 95 °C), nakon toga 30 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije (30 sekundi na 94 °C), ljepljenja početnica (30 sekundi na 62 °C) i produljivanja lanaca (3 minute na 72 °C), te završne polimerizacije nedovršenih lanaca DNA (10 minuta na 72 °C).

Rezultati lančane reakcije polimerazom provjereni su elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu. Za pripremu gela, agarozu je pomiješana u 1X TAE puferu za elektroforezu (priprema 10X: 48,4 g Tris, 11,4 ml ledene octene kiseline i 3,7 g EDTA, do 1L deionizirana voda). Nakon zagrijavanja, u otopinu je dodan etidij bromid početne koncentracije 10 mg/ml, u razrjeđenju 1/10 000. Gel je izliven u kadice za elektroforezu, a nakon polimerizacije gela u jažice su nanoseni uzorci DNA. Pufer za migraciju tijekom elektroforeze bio je također 1X TAE. Elektroforeza se odvijala pod naponom od 10-15mV/cm gela.



### 3.3. Primjena posebnih dijetnih režima

U svrhu provođenja istraživanja utjecaja dokozaheksaenoične kiseline (engl. *docosahexaenoic acid* – *DHA*) na postishemijski upalni odgovor i opseg nastalog ishemijskog oštećenja, miševi *Wt* i *Trl2/luc/gfp* genotipa, starosti 2 - 3 mjeseca ( $n = 9 - 12$ ) podvrgnuti su dijetnim režimima prehrane sa različitim udjelima masnih kiselina. U istraživanju su primijenjena tri izokalorična dijetna režima prehrane: normalna prehrana, dijeta bogata DHA i dijeta siromašna omega-3 nezasićenim masnim kiselinama, u trajanju od 3 mjeseca. Točan sastav dijetne hrane određen je od strane proizvođača metodom plinske kromatografije. Kontrolna prehrana sadržavala je 3,37 g/kg omega-3 i 13,45 g/kg omega-6 nezasićenih masnih kiselina; hrana siromašna omega-3 nezasićenim masnim kiselinama sadržavala je 0,34 g/kg omega-3 i 32,38 g/kg omega-6 nezasićenih masnih kiselina; dok je hrana bogata omega-3 nezasićenim masnim kiselinama sadržavala 7,05 g/kg (od čega je 5,08 g/kg DHA) omega-3 i 15,29 g/kg omega-6 nezasićenih masnih kiselina. Tako je omjer omega-3 i omega-6 nezasićenih masnih kiselina iznosio u kontrolnoj hrani oko 4,0 : 1; u hrani siromašnoj omega-3 nezasićenim masnim kiselinama oko 95,0 : 1; a u hrani bogatoj omega-3 nezasićenim masnim kiselinama oko 2,2 : 1. Skupina miševa koja je primala dijetu bogatu DHA, primala je 0,7 mg/kg/dan DHA, zaštićenog od oksidacije metodom mikroenkapsulacije (MEG-3, Ocean Nutrition Inc.) (168).

### 3.4. Izazivanje ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja mozga na mišjem modelu – metoda privremene okluzije srednje moždane arterije

U istraživanju je za izazivanje ishemijskog oštećenja mozga miša korištena metoda unilateralne privremene intraluminalne okluzije srednje moždane arterije (engl. *tMCAO* – *transient Middle Cerebral Artery Occlusion*) u trajanju od 60 minuta. Metoda je standardizirana, te opće prihvaćena u istraživanjima ishemijskoga oštećenja mozga na životinjskom modelu budući da ima visoki postotak reproducibilnosti rezultata, relativno nisku smrtnost te je manje invazivna od ostalih metoda (169, 170). Operativne zahvate na svim životinjama izvela je jedna osoba kako bi se smanjila varijabilnost veličine lezije. Tijekom cijelog zahvata miš je anestetiziran inhalacijskim anestetikom - 2% Isofluran u 100% kisiku. Tjelesna temperatura održavana je na 37,0 – 37,5 °C pomoću grijane podloge na kojoj

je miš ležao tijekom i nakon operativnog zahvata. Važnost regulacije tjelesne temperature opisana je u radu gdje je dokazano kako hipotermija miša nakon izazivanja ishemijske ozljede mozga pruža znatan neuroprotektivan učinak (171).

Na početku operativnog zahvata miš je bio položen na leđa, te je učinjen rez u području vrata u srednjoj liniji. Meka tkiva i žlijezde slinovnice su odmaknute u stranu kako bi se prikazale zajednička, unutarnja i vanjska karotidna arterija. Lijeva zajednička karotidna arterija izdvojena je od okolnog tkiva, n. vagusa i jugularne vene. Na zajedničkoj karotidnoj arteriji prije račvanja postavljen je prvi čvor svilenim koncem debljine 6-0. Taj čvor je privremen, tj. ostavljen je jedan kraj niti u obliku petlje, čime se omogućilo naknadno odvezivanje čvora jednim potezom. Nakon postavljanja prvog čvora lijeva vanjska karotidna arterija izdvojena je od okolnih struktura, a na njoj je postavljen drugi čvor – trajni čvor, što je distalnije bilo moguće. Treći čvor je postavljen labavo, također na vanjskoj karotidnoj arteriji, proksimalo od drugog čvora, neposredno uz račvište zajedničke karotidne arterije. Nakon postavljanja trećeg čvora, lijeva unutarnja karotidna arterija izdvojena je od okolnih struktura, te je privremeno zatvorena uz pomoć posebne Dumont pincete br. 7, koja je specifična po tome što se sama zatvara, a uz pomoć primjenjene sile otvara, što je obrnuto od principa klasične pincete. Učinjen je maleni poprečni (nepotpuni) rez između drugog i trećeg čvora kroz koji je uvedena monofilamentna nit obložena silikonom, debljine 6-0 (Docol Corporation, Sharon, MA, SAD), te je pogurana proksimalno do račvišta zajedničke karotidne arterije. Zatim je treći čvor pritegnut oko monofilamentne niti koja se sada nalazi u lijevoj vanjskoj karotidnoj arteriji i seže do račvišta. Nakon toga je u potpunosti prerezana vanjska karotidna arterija na istom mjestu gdje je učinjen nepotpuni rez i uveden monofilament. Uklonjena je Dumont pinceta br. 7, a monofilament je pogurnut u unutarnju karotidnu arteriju, a anatomskim slijedom i u Wilisijev krug, na taj način zaustavljajući protok krvi u početnom dijelu srednje moždane arterije. Nit je u pravilu uvedena u duljini od oko 14 mm, mjereći od račvišta zajedničke karotidne arterije, odnosno do pružanja otpora niti što nam govori da je nit sezala do račvišta srednje moždane arterije. Naknadno je pritegnut treći čvor oko monofilamenta kako se ne bi pomaknuo van uslijed pokreta miša u budnom stanju. Rana je zatvorena posebnim privremenim pričvrsnim spajalicama ili šavovima. Miš je potom probuđen iz anestezije i stavljen u grijani kavez na period od 60 minuta.

Nakon 60 minuta okluzije srednje moždane arterije miš je ponovno uspavan u indukcijskoj komori sa plinskim anestetikom - 2% Isofluranom u 100% kisiku. Uklonjene su privremene pričvrstne spajalice ili postavljeni šavovi, a monofilamentna nit je izvučena van do trenutka kada se vrh niti nije približio na udaljenost od oko 2 mm do otvora na vanjskoj karotidnoj arteriji kroz koji je monofilament uveden. Ponovno je postavljena privremena okluzija Dumont pincetom br. 7 na unutarnju karotidnu arteriju, a potom je filament u potpunosti izvađen iz krvne žile. Treći čvor je potom čvrsto pritegnut kako bi se spriječilo naknadno krvarenje. Samozatvarajuća pinceta je potom uklonjena, kao i prvi čvor koji je postavljen na zajedničkoj karotidnoj arteriji na samom početku zahvata. Rana je zatvorena uz pomoć spajalica ili trajnim šavovima pomoću 4-0 svilenog konca. Na kraju zahvata rana je premazana otopinom joda, a naposljetku je miš premješten u kavez, na grijanu podlogu (37 °C) na kojoj je ostao slijedeća 2-3 dana, ovisno o stanju nakon operacije. Cijeli zahvat izveden je pod operacijskim mikroskopom s izvorom hladnog svjetla. Tijekom zahvata korišten je žičani držač (retraktor) kako bi rubovi rane ostali razmaknuti, a eventualni tragovi krvi bili su uklonjeni uz pomoć sterilnih štapića sa namotanom vatom na vrhu. Postoperativno svakom mišu injicirano je 1mL fiziološke otopine dva puta na dan kroz 2-3 dana, tj. dok je boravio u grijanom kavezu kako bi se spriječila dehidracija. Također, svakom mišu bila je osigurana analgezija buprenorfinom 0,1 mL (otopina 0,03 g/mL, doza za miševе 0,05-0,1 mg/kg). Hrana i voda bile su pružene *ad libitum*. U navedenim postupcima korišten je zasebni set instrumenata koji se dezinficirao, a kod svih materijala gdje je to moguće i sterilizirao u suhom sterilizatoru prije svake operacije kako bi se postigli aseptični uvjeti.

### **3.5. Priprema tkiva za histološke analize**

Prilikom pripreme tkiva za izvođenje histoloških metoda (imunohistokemija i bojenje prema Nisslu) koristili smo se metodom perfuzijske fiksacije sa 4% paraformaldehidom (4% PFA) u fosfatnom puferu - PBS (engl. *phosphate buffer saline*) kao fiksativom. Princip perfuzijske fiksacije je taj da se uporabom krvožilnog sustava doboko anestetizirane životinje fiksativ raspodjeli kroz cijelo tijelo, pa tako i u tkivo koje planiramo kasnije koristiti u istraživanju. Perfuzijska fiksacija je optimalna metoda za očuvanje tkiva, budući da fiksacija nastupa prije autolitičkih procesa koji se događaju uslijed umiranja životinje. Postupak perfuzijske fiksacije obuhvaća uspavlivanje životinje, perfuziju fosfatnim puferom, perfuziju fiksativom, te

izolaciju tkiva za daljnje pokuse uz naknadnu postfiksaciju tkiva. Nakon opisane fiksacije tkivo podvrgavamo krioprotekciji, a zatim režemo na kriostatu i pohranjujemo.

### **3.5.1. Perfuzijska fiksacija tijela miša**

Postupak perfuzijske fiksacije miša započet je uspavlivanjem miša letalnom dozom anestezika kloralhidrata (300-350 $\mu$ l, koncentracije 10 mg/ml) primjenjenog intraperitonealno. Nakon što je miš duboko zaspao, škaricama su otvorene abdominalna i torakalna šupljina, te su prikazani jetra i srce. U lijevu klijetku umetnuta je igla debljine 23G, a desna pretklijetka bila je presječena škaricama kako bi se omogućilo otjecanje krvi iz krvožilnog sustava. Najprije je provedena fiksacija sa 30 mL hladnog fosfatnog pufera (engl. *phosphate buffered saline – PBS*), sastava 13,7 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,65 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,4, +4°C. Pred kraj perfuzije fosfatnim puferom iz desne pretklijetke otjecala je prozirna tekućina, a jetra je bila blijede, žućkaste boje što nam je ukazivalo da smo adekvatno isprali krvožilni sustav puferom. Nakon toga uslijedila je perfuzija hladnim fiksativom, 4% paraformaldehid (PFA), +4°C, također 30 mL, opet uz pomoć igle umetnute u lijevu klijetku. Na kraju fiksacije tijelo miša bilo je tvrdo i rigidno, što je bio znak dobro provedene fiksacije.

### **3.5.2. Izolacija mozga, postfiksacija i krioprotekcija**

Nakon provedene fiksacije perfuzijom miša smo dekapitali škaricama, a sa glave je uklonjena koža. Uslijedio je uzdužni rez od *foramen magnuma* prema rostralno, duž *suture sagitalis*. Najprije je uklonjena okcipitalna kost, a zatim i obje ljuske parijetalne kosti. Iznad nosnih bulbusa također je uklonjeno koštano tkivo. Uz pomoć škarica i fine metalne špatule mozak je odvojen od baze lubanje te uronjen u otopinu 4% PFA u svrhu postfiksacije imerzijom. Ostatak tijela miša odložen je privremeno u za to predviđen zamrzivač, a nakon toga je odvezen na spaljivanje. U 4% PFA mozak je bio uronjen sljedeća 24 sata, nakon čega je prebačen u otopinu za krioprotekciju – 30% saharozu otopljenu u fosfatnom puferu. U otopini za krioprotekciju mozak je stajao 3 dana u svrhu dehidracije kako kristali vode prilikom smrzavanja ne bi oštetili morfologiju tkiva. Na početku krioprotekcije u 30% saharozu mozak je plutao na površini, a nakon 3 dana mozak je potonuo na dno bočice u kojoj se nalazio.

### 3.5.3. Rezanje mišjeg mozga na kriostatu i pohrana uzoraka

Nakon postupka krioprotekcije mozak je izvađen iz 30% saharoze i osušen papirnatim ručnikom. Mozak je potom uklopljen u otopinu za rezanje na kriostatu (Tissue Tek, O.C.T, Sakura, SAD), smrznut na  $-80^{\circ}\text{C}$  kako bi se formirao tvrdi blok, koji je potom montiran na držač kriostata (Leica CM3050 S). Na kriostatu su rezani poprečni (frontalni) rezovi debljine  $35\ \mu\text{m}$ , koji su odmah montirani na pozitivno nabijena stakla (Menzel SuperFrost Plus ili Thermo Scientific Colorfrost Plus Slides). Rezovi su montirani na način da su stvarane paralelne serije rezova označene slovima od a-f, kako bi se isti mozak mogao koristiti za 6 različitih pokusa. Potom su staklaca sa rezovima spremljena u adekvatno označene kutije koje su odložene u zamrzivač na  $-20\ ^{\circ}\text{C}$ .

### 3.6. Bojenje presjeka mišjeg mozga prema Nisslu

U svrhu procjene veličine moždane lezije 3, 7 i 14 dana nakon postupka privremene okluzije srednje moždane arterije poprečni presjeci mozga miša bojeni su prema Nisslu, prema standardiziranom protokolu. Rezovi su najprije dodatno fiksirani na stakalca na način da su uronjeni u 100% metanol 10 min, a potom je uslijedila rehidracija rezova; uronjeni su redom u: 95% etanol 15 minuta, 70% etanol 2 minute, 50% etanol 2 minute, destilirana voda 2 minute, ponovno destilirana voda 2 minute. Potom je usijedilo bojenje prema Nisslu, uranjanjem stakalaca sa rezovima na 6 minuta u otopinu koja je sadržavala boju krezil violet (Sastav: 1,25 g krezil violet acetata i 0,75 ml ledene octene kiseline dodaje se u 250 ml tople destilirane vode. Otopina se promiješa, ohladi i filtrira.). Nakon bojenja uslijedilo je ispiranje i dehidracija rezova uranjanjem redom u: destiliranu vodu 2 minute, 50% etanol 2 minute, 70% zakiseljeni etanol (Sastav: 2ml ledene octene kiseline u 200ml 70% etanola) 1 minuta, 95% etanol 2 minute, 95% etanol nekoliko puta umočena stakalca sa rezovima, 100% etanol 2 minute. Prosvjetljavanje je provedeno sa ksilenom uranjanjem stakalaca sa rezovima 2 puta po 3 minute. Uslijedilo je poklapanje preparata sa mješavinom dibutil-ftalata (plastifikator), polistriena i ksilena (engl. *Dibutylphthalate*, *Polystirene*, *Xylene* – *DPX*). Staklaca sa rezovima su ostavljena preko noći u ventilirnoj laboratorijskoj komori, digestoru, kako bi medij za pokrivanje - DPX polimerizirao i očvrstnuo. Slijedeći dan, višak očvrstnutog medija

za pokrivanje odstranio se skalpelom, a stakalca sa rezovima odložena su u obilježene kutije čuvane na sobnoj temperaturi.

### **3.7. Procjena volumena moždane ishemijske lezije i statistička analiza**

Volumen ishemijske lezije, nastale nakon MCAO, procjenjen je u grupi miševa s onemogućenim *Tlr2* genom, kao i u grupi miševa divljeg tipa u vremenskim točkama 3, 7 i 14 dana nakon operativnog zahvata. Broj životinja iznosio je 10/grupi/promatranoj vremenskoj točki. U analizu je bio uključen svaki šesti frontalni presjek kroz mozak dobiven rezanjem na krostatu, te obojen prema Nisslu. Nakon bojenja i poklapanja sa DPX medijem te sušenja, stakalca sa uzorcima su digitalizirana (skenirana) pomoću CanoScan 9950F skenera u rezoluciji 4800 dpi. Za procjenu veličine lezije korišten je kompjuterski program ImageJ (verzija 1.42q za Windows operativni sustav, National Institutes of Health, SAD).

Kvantifikacija volumena ishemijske lezije provedena je na način da su mjereni "izravni" i "neizravni" volumen ishemijske lezije (172). "Izravni volumen ishemijske lezije" je volumen lezije vidljiv na histološkim preparatima kao tkivo ipsilateralne hemisfere koje nije uredne histološke građe (svijetlije, edematozno tkivo 3 dana nakon MCAO, te dio mozga sa zgusnuto zbijenom Nisslovom tvari u kasnijim vremenskim točkama). "Izravni" volumen ishemijske lezije izračunat je na način da je površina lezije (u mm<sup>2</sup>) izračunata na svakom šestom presjeku kroz mozak umnožena sa 6 i s debljinom presjeka (35µm). Krajnja vrijednost bila je izražena u mm<sup>3</sup>. "Neizravni" volumen ishemijske lezije izračunat je formulom: volumen kontralateralne (zdrave) hemisfere – volumen zdravog dijela ipsilateralne hemisfere. "Neizravni volumen ishemijske lezije" predstavljao je stoga volumen mozga koji je oštećen, tj. zahvaćen lezijom, a izračun ima prednost u tome što ne ovisi o procesima stvaranja glijalnog ožiljka, uklanjanja staničnog detritusa i skvrčavanja tkiva. Razlika između ipsilateralne i kontralateralne hemisfere označavala je moždani edem, koji je korišten prilikom korigiranja "izravnog volumena ishemijske lezije" 3 dana nakon MCAO. Dakle, "izravni volumen ishemijske lezije" reflektira procese konsolidacije lezije (stvaranje glijalnog ožiljka), dok "neizravni volumen ishemijske lezije" predstavlja procese progresije ishemijske lezije, i.e. utjecaj promijenjenog upalnog odgovora na razvoj lezije. Navedeni izračuni su izvedeni u skladu sa metodologijom prije publiciranih radova iz istog područja (172).

Prilikom statističke analize, nakon provjere distribucije uzoraka uslijedio je dvostrani Studentov t-test za nezavisne uzorke.

### **3.8. Hibridizacija RNA *in situ* sondom obilježenom radioaktivnim izotopom**

Postupak hibridizacije RNA *in situ* je oblik hibridizacije koja se koristi za lokalizaciju određene sekvence mRNA u tkivu pomoću označenih fragmenata nukleinskih kiselina koji se specifično vežu za komplementarnu sekvencu mRNA u tkivu. U ovom istraživanju proučavala se ekspresija i lokalizacija mRNA sekvence koja kodira TLR2 protein u miševa kojima je izazvana ishemijska moždana lezija. Hibridizacija je provedena na svakom šestom poprečnom presjeku mozga u dijelu gdje je na istom presjeku bilo vidljivo mjesto lezije, kao i zdrava, kontralateralna strana koja je korištena kao kontrola.

#### **3.8.1. Priprema tkiva za postupak hibridizacije RNA *in situ***

Mozgovi koji su korišteni za RNA hibridizaciju *in situ* pripremljeni su na način opisan u odjeljku 3.5.2., uz iznimku što je krioprotekcija provedena u otopini 10% saharoze u trajanju od 24h. Mozgovi su rezani na kliznom mikrotomu na niskoj temperaturi, uz pomoć suhog leda, na frontalne presjeke debljine 25 µm. Presjeci su prilikom rezanja odlagani u hladnu sterilnu otopinu protiv smrzavanja – tzv. antifriz (sastav (za 2L): 250 ml pufera za pripremu antifriza [sastav: monobazični natrijev fosfat 9,52 g, dibazični natrijev fosfat 32,8 g, dopuniti do 1 L sa DEPC vodom (100 µl dietilpirokarbonata u 1 L ultra čiste vode, autoklavirati)], 750 ml DEPC vode, 600 ml etilenglikola bez RNaza, 400 ml glicerola bez RNaza) koji se nalazio u bunarićima na ploči sa 24 bunarića. Odabrane presjeke potrebno je isprati 3 puta po 10 minuta u hladnom kalijevom fosfatnom puferu – KPBS sastava: dibazični kalijev fosfat 15,24 g, monobazični kalijev fosfat 1,8 g, NaCl 32,4 g, DEPC 400 µl, dopuniti do 4 L sa ultra čistom vodom, autoklavirati. Nakon ispiranja presjeci su kistom montirani na poli-L-lizinom presvučena stakalca, te potom osušeni i stavljeni u vakuum na najmanje 2 sata.

### 3.8.2. Prehibridizacija

Prehibridizacija tkiva provedena je u uvjetima bez prisutnih RNaza, u otopinama 4% PFA 20 minuta, 2 puta KPBS u trajanju od 5 minuta, pufer za proteinazu K (priprema: 100 ml Tris-HCl 1M pH 8,0, 100 ml EDTA 0,5 M, pH 8,0, do 1 L DEPC voda) i proteinaza K (priprema: 125 µl otopine proteinaze K koncentracije 25 mg/ml u 250 ml pufera) 25 minuta. Nakon toga je uslijedilo ispiranje: stakalca sa uzorcima su 10 puta uronjena u DEPC vodu, 10 puta u TEA 0,1 M (priprema: 133,3 ml trietanolamina u 7,5M otopini (Sigma) u 1 L miliQ voda, pH 8,0); te acetilacija: 10 minuta u 0,1M TEA sa dodatkom 625 µl kiselog anhidrida, ispiranje u 2X SSC puferu (priprema: NaCl 525,9 g, natrijev citrat 264,6 g, do 3L miliQ voda, pH 7,0) te dehidracija u uzlaznom nizu alkohola (50% etanol 3 minute, 70% etanol 3 minute, 95% etanol 3 minute, 100% etanol 3 minute, 100% etanol 3 minute). Stakalca su potom ostavljena 2 sata u vakuumu kako bi se osušila.

### 3.8.3. Priprema radioaktivnim izotopom obilježene sonde

TLR2 sonda duljine 2278 parova baza (pb) (od 323-2601 pb, Genebank referenca AF185284) umnožena je pomoću postupka lančane reakcije polimerazom korištenjem gornje početnice: 5'GGC-TCT-TCT-GGA-TCT-TGG-TGG-CC-3' i donje početnice: 5'-GGG-CCA-CTC-CAG-GTA-GGT-CTT-GG-3'. Insert je potom umetnut u PCR Blunt-II topo vektor, a budući da postoje različita mjesta za vezanje polimeraze na svakoj strani inserta, korištenjem SP6 polimeraze dobivena je *antisense* sonda, a korištenjem T7 polimeraze dobivena je *sense* sonda. Obilježavanje sonde radioaktivnim izotopom učinjeno je na način da je po jednoj reakciji u 8 µl S<sup>35</sup>-dUTP, radioaktivnosti 100 µCi (Perkin Elmer) dodan 1µL transkripcijskog pufera, 1,5 µl DEPC vode, 0,5 µl DTT, 1 µl mješavine dGTP-dATP-dCTP, 0,6 µl RNasin-a, 1 µl sonde DNA (250 µg/µl) te 0,6 µl polimeraze. Reakcijska smjesa je potom promiješana, te inkubirana u 90 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije dodano je 100 µl otopine DNaze (1 µl DNaze, 2,5 µl tRNA koncentracije 10mg/ml, 94 µl 10 mM Tris/10mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µl DEPC vode), 10 minuta na sobnoj temperaturi. Uslijedila je ekstrakcija dodavanjem 100 µl fenol kloroforma 1:1, miješanje 2 puta po 5 minuta i naposljetku centrifugiranje nakon kojega je 115 µl gornje faze uzeto i inkubirano sa 20 µl 5M amonijevog acetata, pH 5,5 i 500 µl 100% etanola, 20 minuta na suhom ledu. Nakon centrifugiranja supernatant je uzet uz pomoć pipete, nakon čega je uslijedilo sušenje na sobnoj temperturi 10 minuta, a stvoreni talog je ponovno



otopljen u 50  $\mu$ l TE pufera (2,5 ml Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mL EDTA, pH 8,0, 247 mL DEPC vode. Ovako otopljena DNA predstavljala je sondu označenu radioaktivnim  $S^{35}$ -dUTP (173). Uspješnost vezanja mjerena je scintilacijskim brojačem dodavanjem 1  $\mu$ l pripremljene sonde u 10 ml scintilacijske tekućine. Iz dobivenih vrijednosti izračunat je broj konjugiranih  $S^{35}$ -dUTP po oligonukleotidu, kao i postotak uspješnosti označavanja sonde radioaktivnim sumprorom.

#### **3.8.4. Hibridizacija**

Pripremljena je otopina za hibridizaciju: za 1 ml (dovoljno za 11 stakalaca): 822  $\mu$ l hibridizacijskog pufera (10 ml 50% dekstran sulfata, 25 ml deioniziranog formamida, 3ml 5M NaCl, 500  $\mu$ l Tris-HCl 1M, pH 8,0; 100  $\mu$ l EDTA 0,5M, pH 8,0; 1 ml Denhartove otopine 50X [5g fikola, 5g polivinilpirolidona, 5g BSA (frakcija V), do 500 mL DEPC voda], 1,5 ml DEPC vode), 50  $\mu$ l tRNA 10 mg/ml (100 mg tRNA bez RNaza u 10 ml DEPC vode), 10  $\mu$ l DTT 1M (5g DTT u 32,36 ml DEPC vode), 118  $\mu$ l DEPC vode koja sadržava sonde (10 milijuna cpm). Otopina za hibridizaciju ugrijana je na temperaturu od 60 °C. 90  $\mu$ l otopine za hibridizaciju stavljeno je na stakalce, koje je pokriveno pokrovnicom, te ostavljeno preko noći u vlažnoj komori na 60 °C.

#### **3.8.5. Posthibridizacija i autoradiografija**

Nakon što se hibridizacija odvijala preko noći na 60 °C, stakalca su uronjena u SSC 4X pufer 30 minuta. Pokrovna stakalca su oprezno skinuta, a stakalca sa rezovima su isprana 4 puta po 5 minuta otopinom SSC 4X pufera uz dodatak 250  $\mu$ l 1M DTT, a potom inkubacija sa RNazom 500  $\mu$ l koncentracije 10 mg/ml u RNaza puferu 30 minuta na 37 °C. Uslijedila je serija ispiranja 5 minuta (2X SSC + 250  $\mu$ l DTT 1M), 5 minuta (2X SSC + 250  $\mu$ l DTT 1M), 5 minuta (1X SSC + 250  $\mu$ l DTT 1M), 10 minuta (0,5X SSC + 250  $\mu$ l DTT 1M), 30 minuta na 60 °C (0,1X SSC + 250  $\mu$ l DTT 1M), 10 kratkih uranjanja (0,1X SSC + 250  $\mu$ l DTT 1M), 3 minute (50% etanol + 250  $\mu$ l DTT), 3 minute (70% etanol + 250  $\mu$ l DTT), 3 minute (95% etanol), 3 minute (100% etanol), 3 minute (100% etanol). Stakalca sa rezovima su potom osušena i stavljena u vakuum na 30 minuta.

U kazetu za razvijanje posložena su stakalca sa osušenim rezovima na koja je stavljen autoradiografski film (Kodak XAR/5). Ekspozicija je trajala preko noći, a film je potom razvijen u tamnoj komori, skeniran i analiziran kako bi se odredili rezovi s najboljim signalom.

### **3.8.6. Vizualizacija hibridizacije RNA *in situ* pomoću fotografske emulzije**

Stakalca koja su sadržavala rezove s najboljim signalom najprije su odmašćena, a potom uronjena u NTB2 fotografsku emulziju. Odmašćivanje je provedeno uranjanjem 5 min u 95% etanol, 3 puta po 5 min u 100% etanol, 10 minuta u ksilen (korišteni), 30 minuta u čisti ksilen, 3 puta po 5 minuta u 100% etanol, nakon čega su ostavljena na zraku kako bi se osušila i poptom u vakuumu. Fotografska emulzija je pomiješana sa miliQ vodom u omjeru 1:1, i ostavljena 30 minuta uz polagano mješanje na 42 °C. Stakalca sa rezovima nakratko su uronjena u pripremljenu fotografsku emulziju, osušena na zraku 2 sata, te pohranjena u kutiju omotanu aluminijskom folijom na period od 2 tjedna na temperaturi od 4 °C. Nakon 2 tjedna stakalca sa rezovima izvađena su s 4 °C, te ugrijana na sobnu temperaturu. Svježe pripremljeni razvijач (D19, Kodak) i fiksir ohlađeni su na 14 °C. Stakalca su uronjena na 3,5 minute u razvijач (Rapid fixer, Kodak), 15 sekundi u vodu, 5 minuta u fiksir, te 1 sat u posudi sa stalnim protokom hladne vode (23-26 °C). Uslijedio je niz uranjanja u milliQ vodu, 50% etanol, 70% etanol, 2 puta u 95% etanol, 3 puta po 1 minutu u 100% etanolu, 3 puta po 3 minute u ksilenu. Na kraju postupka stakalca sa rezovima pokrivena su DPX medijem za poklapanje, te analizirani svjetlosnim mikroskopom uz korištenje tamnog vidnog polja (Leica DM5000B).

### **3.9. Imunohistokemija sa sekundarnim protutijelom obilježenim biotinom**

Imunohistokemijska analiza pomoću biotinom obilježenog sekundarnog protutijela u ovome istraživanju korištena je za obilježavanje apoptotičnih stanica uz pomoć protutijela koje je specifično obilježavalo efektornu cijepanu kaspazu-3 (engl. *anti-cleaved caspase-3*). Imunohistokemijsko obilježavanje provedeno je u vremenskim točkama 3, 7 i 14 dana nakon izazivanja ishemijske ozljede mozga na miševima sa onemogućenim *Tlr2* genom, kao i na miševima divljeg tipa, prema ranije publiciranom protokolu (65, 162).

Prednost imunohistokemije sa sekundarnim protutijelom obilježenim biotinom je krajnji signal koji nije osjetljiv na svjetlost, preparat je time dugotrajan, a analizu dobivenog signala moguće je učiniti i nakon nekoliko godina. U ovom istraživanju postupak je korišten za potrebe stereološke analize signala, a budući da se radi o analizi koja podrazumijeva dugotrajno osvjetljavanje preparata, potrebno je obilježavanje substratom koji ne blijedi prilikom dugotrajnog izlaganja izvoru svjetlosti. U ovom slučaju radi se o tamno plavo-crnim substratu, 3, 3'-diaminobenzidinu (DAB).

Uzorci (poprečni presjeci mozгова na stakalcima) su najprije izvađeni iz hladnjaka (-20°C), te stavljeni u vakuum na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 sata, kako bi presjeci što bolje prionuli uz stakalce i kako ne bi otpadali u daljnjim koracima. U slijedećem koraku uzorci su isprani 4 puta po 5 minuta sa fosfatnim puferom kako bi se odstranila tekućina za uklapanje (TissueTek). Uslijedilo je blokiranje endogene peroksidaze sa 0,6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u fosfatnom puferu u trajanju od 15 minuta. Nakon ispiranja PBS-om 4 puta po 5 minuta uzorci su inkubirani 60 minuta sa sredstvom za blokiranje epitopa (sprječavanje nespecifičnog vezanja), a koje je sadržavalo 10% kozji serum u PBS-u uz dodatak 0,25% Tritona X-100, sredstva za poboljšanje permeabilnosti. Nakon blokiranja epitopa, uzorci su inkubirani preko noći na sobnoj temperaturi sa primarnim nekonjugiranim protutijelom na cijepanu kaspazu-3 u razrjeđenju 1:400 (Cell Signaling, kat. br. 9661S), porijeklom od zeca. Protutijelo je bilo razrijeđeno u fosfatnom puferu koji je sadržavao 5% kozji serum i 0,25% Triton X-100.

Sljedeći dan uzorci su isprani 4 puta po 5 minuta sa PBS-om koji je sadržavao 0,25% Triton X-100. Uslijedilo je inkubiranje uzoraka sa sekundarnim protutijelom obilježenim biotinom, razrijeđenog 1:500 u PBS-u koji je sadržavao 0,25% Triton. Protutijelo potječe od kože, a specifično se veže na teški i laki lanac primarnog protutijela porijeklom od kunića (Vectorlabs, kat. br. BA-1000). Za amplifikaciju pozitivnog signala, uzorci su inkubirani sa avidin-biotin kompleksom 60 minuta (Vectastain ABC Elite kit Standard, Vectorlabs, kat. br. PK6100, priprema prema uputi proizvođača). Uslijedilo je ispiranje uzoraka 3 puta 5 minuta PBS-om, 2 puta po 5 minuta destiliranom vodom, te razvijanje otopinom 3,3'-diaminobenzidina (DAB) kroz 3-5 minuta (Vectorlabs, kat. br. SK-4100). Reakcija razvijanja je zaustavljena pomoću destilirane vode, a nakon temeljitog ispiranja 4 puta 5 minuta sa destiliranom vodom uzorci su dehidrirani u nizu uzlaznih koncentracija alkohola (50% etanol

2 minute, 70% etanol 2 minute, 95% etanol 2 minute, 100 % etanol 2 minute). Nakon toga uzorci su prosvijetljeni ksilenom 2 puta po 3 minute i pokriveni DPX sredstvom za poklapanje. Preparati su se sušili preko noći, a nakon čišćenja spremljeni su u označene kutije i pohranjeni na sobnoj temperaturi.

### **3.10. Stereološka procjena broja apoptotičnih i CD3<sup>+</sup> stanica**

Procjena broja apoptotičnih stanica provedena je na uzorcima mozgovia miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom i divljeg tipa 3, 7 i 14 dana nakon MCAO (n=4/skupini /vremenskoj točki). Analiza je provedena na uzorcima poprečnih presjeka mozgovia obilježenih protutijelom protiv cijepane kaspaze-3, metodom imnohistokemije sa netopljivim substratom (DAB), kao što je prethodno opisano u odjeljku 3.9. Procjena broja CD3 pozitivnih stanica (infiltriranih limfocita T) provedena je na kontrolnim uzorcima, te 3 i 7 dana nakon MCAO u skupinama *Tlr2*<sup>-/-</sup> i *WT* miševa. Kvantifikacija je u oba slučaja uključivala svaki 6 poprečni presjek kroz mozak. Broj pozitivno označenih stanica procijenjen je uporabom metode optičkog frakcioniranja pomoću Nikon Eclipse 80i stereološkog mikroskopa opremljenim programom Stereo Investigator. Na ipsilateralnoj (ishemičnoj) hemisferi najprije je označena lezija korištenjem 4x Plan Achromat objektiva, a uzorkovanje uz pomoć 60x Plan Achromat objektiva) Nikon, El Segundo, SAD). Parametri analize bili su veličina okvira brojanja (Š: 100 μm x V: 100 μm), mreža uzorkovanja (Š: 500 μm x V: 500 μm) te rubna zona debljine 1,5 μm. Kvantifikacija je bila provedena na području cijele ishemijske lezije, a rezultati izraženi kao broj stanica po mm<sup>3</sup>. Podaci su naknadno statistički obrađeni, a nakon provjere distribucije proveden je dvostrani Studentov t-test za nezavisne uzorke.

### **3.11. Imunohistokemija s fluorescentno obilježenim sekundarnim protutijelima**

Imunohistokemijsko obilježavanje fluorescentnom bojom obilježenim sekundarnim protutijelima (imunofluorescencija - IF) provedeno je na uzorcima poprečnih presjeka mozgovia miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom, kao i na miševima divljeg tipa prema prethodno opisanom protokolu (65). Analiza je provedena korištenjem samo jednog protutijela, a

rezultat je korišten za analizu intenziteta signala mjerenjem optičke gustoće, ili uz pomoć dva protutijela, u slučaju kada je bilo nužno prikazati kolokalizaciju, tj. prisutstvo dva antigena u istoj stanici. Imunofluorescentna analiza provedena je u vremenskim točkama 3, 7 i 14 dana nakon izazivanja ishemijske ozljede mozga, kao i na kontrolnim uzorcima, tj. na uzorcima poprečnih presjeka mozga miševa koji nisu bili podvrgnuti MCAO.

Protokol imunofluorescentnog obilježavanja tkiva sastoji se od nekoliko koraka. Uzorci su najprije izvađeni iz hladnjaka (-20 °C), i stavljeni u vakuum na sobnoj temperaturi u periodu od 2 sata, kako bi presjeci što bolje prionuli uz stakalce i kako ne bi otpadali u daljnim koracima. U sljedećem koraku uzorci su isprani 4 puta po 5 minuta sa fosfatnim puferom kako bi se odstranila tekućina za uklapanje i rezanje na kriostatu (TissueTek). Nakon ispiranja slijedi blokiranje epitopa u tkivu sa ciljem izbjegavanja nespecifičnog vezanja. To se postiže inkubacijom uzoraka sa 10% kozjim serumom (ili konjskim ukoliko je jedno od primarnih protutijela proizvedeno u kozi). Serumu se dodaje 0,25% permeabilizacijski agens Triton X-100 koji poboljšava prodiranje protutijela unutar stanice. Inkubacija je trajala 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja epitopa uzorci su se inkubirali preko noći sa primarnim protutijelom koje se specifično veže na antigen koji želimo vizualizirati (*Tablica 4*). Primarno protutijelo je prema uputama proizvođača ili prema raspoloživoj literaturi razrijeđeno u fosfatnom puferu koji je sadržavao 0,25% Triton X-100 i 1% kozji odnosno konjski serum, opet, ovisno o porijeklu primarnog protutijela.

*Tablica 4.* Popis primarnih protutijela korištenih u postupcima imunofluorescentne analize.

<b>Protutijelo</b>	<b>Porijeklo</b>	<b>Monoklonalno / poliklonalno</b>	<b>Razrjeđenje</b>	<b>Tvrka</b>	<b>Kataloški broj</b>
anti-BrdU	štakor	poliklonalno	1:2000	Axyl /AbD Serotec	OBT0030
anti-BrdU, konjugirano s Alexa Fluor 488	miš	monoklonalno	1:400	Invitrogen	B35130
anti-CD3	štakor	monoklonalno	1:200	BD Pharmingen	555273
anti-CD11b	štakor	monoklonalno	1:50	AbD Serotec	MCA711
anti-CD68	štakor	monoklonalno	1:2000	AbD Serotec	MCA1957
anti-cleaved caspase-3	kunić	poliklonalno	1:400	Cell Signaling	9661S

<b>Protutijelo (nastavak)</b>	<b>Porijeklo</b>	<b>Monoklonalno / poliklonalno</b>	<b>Razrjeđenje</b>	<b>Tvrka</b>	<b>Kataloški broj</b>
anti-GFAP	miš	monoklonalno	1:1000	Millipore	MAB360
anti-GFAP	kunić	poliklonalno	1:500	Dako	Z0334
anti-Iba-1	kunić	poliklonalno	1:500	Wako	019-19741
anti-IGF-1	miš	monoklonalno	1:50	Millipore / Upstate	05-172
anti-Mac2	štakor	monoklonalno	1:500	ATCC	---
anti-Map2	kunić	poliklonalno	1:1000	Millipore	AB5622
anti-NeuN	miš	monoklonalno	1:300	Millipore	MAB377
anti-TLR2	miš	monoklonalno	1:250	eBioscience	14-9022-82

Nakon inkubacije sa nekonjugiranim primarnim protutijelima, stakalca sa uzorcima su isprana 4 puta po 5 minuta sa fosfatnim puferom koji je sadržavao Triton X-100. Uslijedilo je inkubiranje uzoraka u periodu od 2 sata sa fluorescentno obilježenim sekundarnim protutijelima, specifičnima na primarna protutijela izolirana iz pojedine životinjske vrste. Popis korištenih sekundarnih protutijela nalazi se u *Tablici 5*. Iznimka je obilježavanje uzoraka sa anti-BrdU protutijelom koje je konjugirano sa fluorescentnom bojom Alexa Fluor 488, pa su koraci inkubacije sa fluorescentnim sekundarnim protutijelom izostavljeni.

*Tablica 5.* Popis korištenih sekundarnih, fluorescentnom bojom obilježenih, protutijela.

<b>Protutijelo</b>	<b>Porijeklo i specifičnost</b>	<b>Razrjeđenje</b>	<b>Tvrka</b>	<b>Kataloški broj</b>
Alexa Fluor 488	koza anti-miš	1:500	Invitrogen	A11029
Alexa Fluor 488	koza anti-štakor	1:500	Invitrogen	A11006
Alexa Fluor 488	koza anti-kunić	1:500	Invitrogen	A11034
Alexa Fluor 594	koza anti-miš	1:500	Invitrogen	A11005
Alexa Fluor 594	koza anti-štakor	1:500	Invitrogen	A11007
Alexa Fluor 594	koza anti-kunić	1:500	Invitrogen	A11012

Po isteku perioda inkubacije sa sekundarnim protutijelom, uslijedilo je ispiranje uzoraka sa otopinom fosfatnog pufera s Tritonom X-100 3 puta po 5 minuta, a nakon toga samo sa fosfatnim puferom 2 puta 5 minuta. Na kraju, uzorci su isprani destiliranom vodom 2 puta po 1 minutu i poklopljeni Fluoromountom G (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, SAD) – medijem koji štiti fluorescenciju i na taj način produljuje vrijeme potrebno za mikroskopijsku analizu uzoraka. Stakalca sa uzorcima su ostavljena u mraku preko noći kako bi se medij za pokrivanje osušio, a sljedeći dan su očišćena i pohranjena u označene kutije u mračnu prostoriju na sobnoj temperaturi.

### **3.12. Kvantifikacija intenziteta fluorescentnog signala i statistička analiza**

Kvantifikacija imunofluorescentnog signala provedena je na uzorcima poprečnih presjeka miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom, kao i kod miševa divljeg tipa u vremenskim točkama 3 i 7 dana nakon MCAO zahvata, te na kontrolnim presjecima mozga miševa koji nisu bili podvrgnuti MCAO (kontrolna skupina). Kvantifikacija je provedena nakon obilježavanja tkiva protutijelima anti-Iba1, anti-CD68, anti-BrdU, anti-Mac2, anti-IGF-1. Analiza je provedena na način da su najprije fotografirana po 4 nasumična vidna polja u području ishemijske lezije na ipsilateralnoj strani i 4 odgovarajuća polja na kontralateralnoj strani (kontrola imunofluorescentnog označavanja). Analizirano je deset rezova montiranih na stakalce nakon rezanja na kriostatu (svaki 6 presjek se nalazio na predmetnom stakalcu). Prilikom fotografiranja korišten je fluorescentni mikroskop Leica DM5000B sa objektivom 20x Plan Fluotar, te digitalnom kamerom. Intenzitet signala je procijenjen pomoću ImageJ programa, na način da je mjerena integrirana optička gustoća signala, što odražava vrijednost intenziteta fluorescencije po jedinici površine. Vrijednost mjerenja je izražena u arbitrarnim jedinicama (65). Nakon provjere distribucije izračunata je aritmetička sredina vrijednosti procijenjenih intenziteta fluorescentnog signala za svaki mozak, a vrijednosti su potom analizirane pomoću dvostranog Student t-testa za nezavisne uzorke.

### 3.13. Obilježavanje proliferirajućih stanica bromodeoksiuridinom

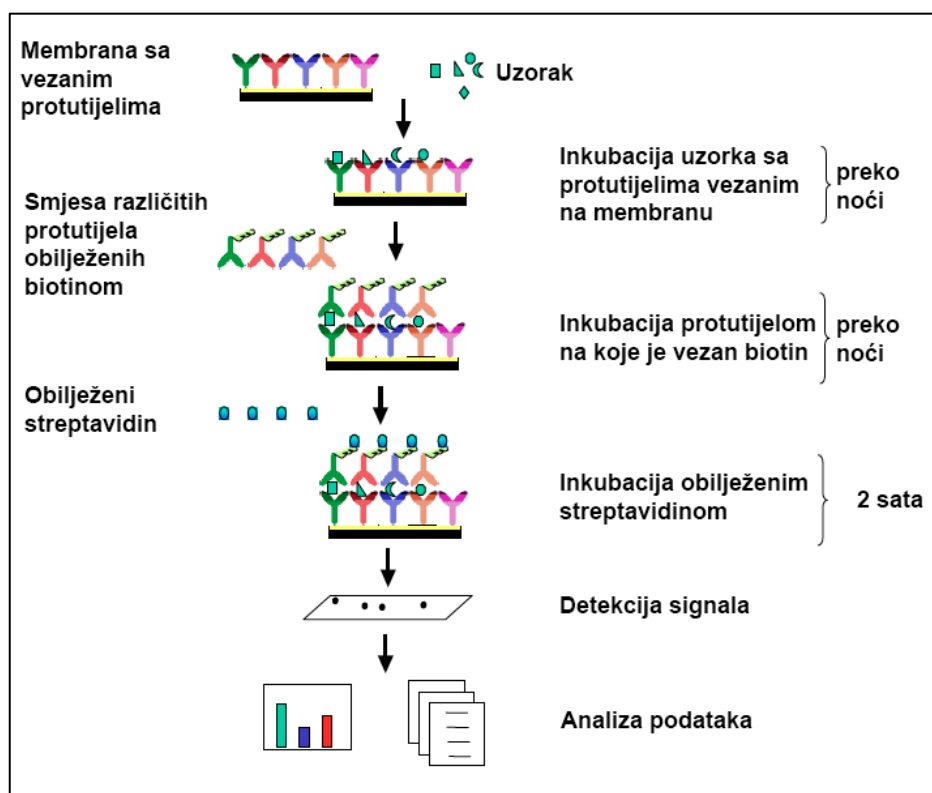
Proliferirajuće stanice vizualizirane su na način da su miševi injicirani sa bromodeoksiuridinom (5-bromo-2'-deoksiuridin - BrdU), sintetskim nukleozidom, analogom timidina koji se ugrađuje u novo-sintetiziranu DNA u stanicama koje se dijele. Doza primjenjenog BrdU iznosila je 50 µg/g tjelesne težine, a pripremljen je na način da je 15 mg BrdU (Sigma, kat. br. B5002-5G) otopljeno u 15 mL fiziološke 0,9% NaCl otopine. Otopina je bila zaštićena od izvora svjetlosti. BrdU je bio primjenjen u obliku intraperitonealne injekcije (5 µl otopine po gramu tjelesne težine). Injekcija je primijenjena neposredno prije MCAO, te 2, 24 i 48h nakon MCAO. 72h nakon MCAO miševi su anestazirani intraperitonealnom injekcijom kloralhidrata (150mg/kg, 300-350 µl otopine koncentracije 10 mg/ml), nakon čega je uslijedila transkardijalna perfuzija fosfatnim puferom (PBS) i potom perfuzija fiksativom 4% paraformaldehidom. Mozgovi su zatim izolirani, post-fiksirani 24 h u 4% paraformaldehidu, nakon čega je uslijedila krioprotekcija 3 dana u 30% saharozi i rezanje na kriostatu na 35 µm debele poprečne (frontalne) rezove koji su odmah montirani na pozitivno nabijena stakalca.

Pre tretman tkiva za vizualizaciju BrdU proveden je na način da su uzorci (poprečni rezovi mišjeg mozga) fiksirani sa 4% PFA 10 minuta, isprani 4 puta 5 minuta sa kalijevim fosfatnim puferom (KPBS), te inkubirani na 30 minuta u vlažnoj komori sa 2M HCl koji uzrokuje kiselu denaturaciju proteina. Reakcija je potom zaustavljena pomoću 0,1M natrijevog borata (borax), pH 8,5 koji je neutralizirao primijenjeni HCl. Nakon toga uslijedilo je ispiranje 4 puta po 5 minuta KPBS, na što se nastavljao klasični protokol imunofluorescencije. Za potrebe mjerenja integrirane optičke gustoće signala na uzorcima proveden je protokol imunofluorescencije sa primarnim protutijelom specifičnim za BrdU i adekvatnim sekundarnim protutijelom (prethodno opisan u odjeljku 3.11.). Intenzitet signala procjenjen je kao što je opisano u odjeljku 3.12. U slučaju dokazivanja kolokalizacije, primijenjena je metoda dvostruke imunofluorescencije. Najprije je proveden postupak obilježavanja primarnim (npr. anti-Iba1 protutijelom) i sekundarnim fluorescentnim protutijelom (kao u odlomku 3.11), a nakon toga je proveden pretretman tkiva za BrdU i naknadna imunofluorescencija sa primarnim anti-BrdU protutijelom konjugiranim sa Alexa Fluor 488 fluoroforom.



### 3.14. Analiza izražaja upalnih citokina pomoću RayBio® membrane

Analiza izražaja upalnih citokina provedena je pomoću membrane koja je na sebi imala nanescena protutijela specifična na 40 upalnih citokina miša (RayBio Mouse Inflammation Antibody Array 1 kit, kat. br. AAM-INF-1, RayBiotech, Norcross, GA, SAD), u dvije vremenske točke, 1 i 4 dana nakon izazivanja MCAO (65, 168).



Slika 8. Shematski prikaz ključnih koraka u analizi upalnih citokina pomoću RayBio® membrane. Preuzeto i prilagođeno iz (174).

#### 3.14.1. Priprema uzoraka, inkubacija na RayBio® membranama i vizualizacija signala

Miševi sa onemogućenim *Tlr2* genom i miševi divljeg tipa (n=4/skupini/vremenskoj točki) anestetizirani su intraperitonealnom injekcijom kloralhidrata (10 mg/ml), te transkardijalno prožeti sa 50 ml fiziološke otopine kako bi se isprala krv iz krvožilnog sustava. Mozgovi sa vidljivom ishemijskom lezijom su potom izolirani, razdvojeni na ipsilateralnu i

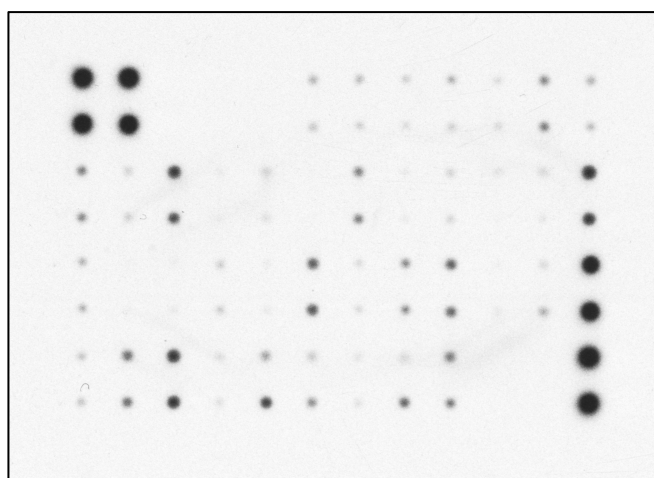
kontralateralnu hemisferu, te brzo smrznuti u tekućem dušiku. Proteinski lizati dobiveni su homogenizacijom hemisfera *Tlr2*<sup>-/-</sup> i *WT* miševa u puferu za lizu stanica 1X (dio navedenog kita), uz dodatak inhibitora proteaza (#P8340, Sigma). Koncentracije proteina u uzorcima određene su metodom prema Bradfordu, koja se temelji na mjerenju absorbancije uzorka bjelančevina i Bradford reagensa (BioRad), čiji je osnovni sastojak Coomassie Brilliant Blue G-250 boja. Intenzitet boje koja nastaje reakcijom proteina i Bradford reagensa mjerena je spektrofotometrom pri valnoj duljini od 595 nm. Koncentracija proteina očitana je iz baždarne krivulje dobivene analizom izmjerenih absorbancija otopina poznatih koncentracija (BSA 0,1 - 1,0 mg/ml).

Po 4 uzorka (jedna skupina u jednoj vremenskoj točki) ravnomjerno su pomiješani, ovisno o koncentracijama u uzorku, kako bi se na kraju dobio uzorak koji je sadržavao 500 µg proteina. Potom je uzorak razrijeđen deset puta u 1X puferu za blokiranje epitopa, nakon čega je uslijedila inkubacija 1 ml uzorka na membranama preko noći na 4 °C. Nakon ispiranja (3 puta po 5 minuta dodavanjem 2 ml 1X pufera za ispiranje I, te 2 puta po 5 minuta dodavanjem 2 ml 1X pufera za ispiranje II), membrane su bile inkubirane sa otopinom koja je sadržavala biotinom konjugirano protutijelo, 1ml razrijeđenog protutijela po membrani. Uslijedila je inkubacija preko noći na 4 °C. Nakon ponovnog ispiranja na svaku membranu je dodano 2ml streptavidina obilježenog peroksidazom hrena (engl. *HRP* – *horseradish peroxydase*) razrijeđenoga 1/1000 u puferu za blokiranje. Nakon inkubacije u trajanju od 2 sata uslijedilo je ispiranje na isti način kao što je to opisano u prethodnim koracima. Potom je učinjena reakcija detekcije signala na način da su membrane inkubirane 2 minute sa otopinom za detekciju (dio kita), nakon čega je uslijedila ekspozicija na autoradiografskom filmu (Biomax MR1; #8701302; Kodak) u trajanju od 20 sekundi. Film je potom razvijen, a membrane su pohranjene na -20 °C za slučaj potrebe kasnije analize.

### **3.14.2. Kvantifikacija signala i statistička analiza**

Autoradiografski filmovi digitalizirani su Agfa Arcus II skenerom u rezoluciji od 300 dpi (*Slika 9*). Intenzitet signala (optička gustoća signala) pojedinih polja koja predstavljaju pojedine citokine, te pozitivne i negativne kontrole (svako polje izvedeno je u duplikatu) izmjeren je pomoću ImageJ programa (*Slika 10*). Pozadina je uklonjena prilikom skeniranja, na način da je od svih vrijednosti na pojedinoj membrani oduzeta srednja vrijednost

intenziteta 6 polja na kojima nije nanešeno protutijelo. Nakon mjerenja optičke gustoće svih polja na membranama, uslijedila je korekcija signala pojedinih membrana s obzirom na vrijednost pozitivnih kontrola, kako bi se rezultati različitih membrana mogli uspoređivati. Naime, svaka membrana ima 6 polja na kojima su nanešene pozitivne kontrole. Najprije su izračunate srednje vrijednosti pozitivnih kontrola pojedinih membrana, nakon čega su međusobno normalizirane. Analize je provela osoba koja nije bila upućena u eksperiment kako bi rezultati bili nepristrani. Navedeni postupci su standardizirani i propisani od strane proizvođača (upute dobivene uz kit). Statistička analiza provedena je pomoću dvostranog Student t-testa za nezavisne uzorke.



Slika 9. Primjer RayBio® membrane nakon digitalizacije i subtrakcije pozadine.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	POS	POS	NEG	NEG	Blank	BLC	CD30 L	Eotaxin	Eotaxin-2	Fas Ligand	Fractalkine	GCSF
2	POS	POS	NEG	NEG	Blank	BLC	CD30 L	Eotaxin	Eotaxin-2	Fas Ligand	Fractalkine	GCSF
3	GM-CSF	IFN $\gamma$	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12p40p70	IL-12p70
4	GM-CSF	IFN $\gamma$	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12p40p70	IL-12p70
5	IL-13	IL-17	I-TAC	KC	Leptin	LIX	Lymphotactin	MCP-1	MCSF	MIG	MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\gamma$
6	IL-13	IL-17	I-TAC	KC	Leptin	LIX	Lymphotactin	MCP-1	MCSF	MIG	MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\gamma$
7	RANTES	SDF-1	TCA-3	TECK	TIMP-1	TIMP-2	TNF $\alpha$	sTNF RI	sTNF R II	Blank	Blank	POS
8	RANTES	SDF-1	TCA-3	TECK	TIMP-1	TIMP-2	TNF $\alpha$	sTNF RI	sTNF R II	Blank	Blank	POS

Slika 10. Legenda – raspored polja na RayBio® membrani (RayBio Mouse Inflammation Antibody Array 1), sa istovremenom detekcijom 40 upalnih citokina.

### 3.15. Protočna citometrija i analiza broja upalnih stanica

Metoda protočne citometrije korištena je za procjenu broja prisutnih mononuklearnih stanica i njihovih podvrsta na području ishemijske lezije, te za procjenu stupnja njihove proliferacije kao komponente upalnog odgovora na nastalo oštećenje. Procjena je provedena 3 i 7 dana nakon MCAO, na miševima sa onemogućenim *Tlr2* genom, kao i na miševima divljeg tipa (n=4/skupini/vremenskoj točki). Radi *in vivo* BrdU označavanja proliferirajućih stanica, miševi su injicirani sa 100 µl otopine BrdU (dio BD BrdU Flow kita, kat. br. 559619), intraperitonealno 12, 24 i 36 h prije žrtvovanja.

#### 3.15.1. Priprema stanica za protočnu citometriju

Priprema stanica izvedena je na standardiziran način, u skladu s prije publiciranim radovima, korištenjem Percoll gradijenta, prema protokolu za izolaciju upalnih stanica iz mozga nakon MCAO (88, 89). Miš je anestetiziran intraperitonealnom injekcijom klorahidrata, a zatim transkardijalno perfundiran sa 50 ml sterilne fiziološke otopine (0,9% NaCl) kako bi se ukonila sva krv iz krvožilnog sustava. Nakon dekapitacije i izolacije mozga, ipsilateralna i kontralateralna hemisfera su razdvojene i uronjene u 2 ml Hibernate-A (Gibco) medija bez seruma, na ledu. Za potvrdu genotipa miševa uzeti su bioptati uha, koji su također bili čuvani na ledu, do početka protokola opisanog u odjeljku 3.2. Mozgovi su potom trituirani u teflonskom homogenizatoru sa 3-4 polagana pokreta gore/dolje, u 2 ml prethodno pripremljenog medija (1X HBSS sa  $\text{Ca}^{2+}$  (Gibco), papain 2 mg/ml (Sigma Aldrich), 200 µl DNaze I (Worthington Biochemicals) koncentracije 1000 Kunitz jedinica/ml), te inkubirani 30 minuta na 37 °C na orbitalnoj mješalici. Suspenzija stanica je potom protisnuta kroz najlonsko sito za razdvajanje stanica (pore veličine 70 µm, BD), te centrifugirana 2 puta po 10 minuta na 800g, 18 °C sa ispiranjem između (5 ml 1X HBSS bez  $\text{Ca}^{2+}$  po uzorku). Nadalog je uklonjen, a talog je resuspendiran u 4 ml 37% otopine izotoničnog Percoll-a (GE Healthcare, Uppsala, Švedska) po uzorku. Ispod 37% Percoll-a nježno je dodano 4 ml 70% Percoll-a, a na vrhu 4 ml 30% Percoll-a. Tako stvoreni gradijent koncentracije Percoll-a centrifugiran je 40 minuta na 500g, 18 °C. Nadtalog koji je sadržavao stanični debris uklonjen je, a pomoću pipete sakupljena je interfaza (2 - 2,5 ml) u području 37-70% Percoll-a koja je sadržavala upalne stanice. Stanice su potom isprane (6 ml 1X HBSS bez  $\text{Ca}^{2+}$  na svakih 2 ml sakupljene interfaze) i centrifugirane 7 minuta na 500g, 4 °C. Nakon uklanjanja nadtaloga

stanice su resuspendirane, isprane 2x sa 500  $\mu$ l 1X HBSS bez  $\text{Ca}^{2+}$  po uzorku, nakon čega je uslijedila inkubacija u otopini za blokiranje (PBS1X (Gibco), 1% BSA (Sigma Aldrich), 4% kozji serum (Gibco), 0,1% natrijev azid (Sigma Aldrich), 15 minuta na 4 °C uz miješanje.

### 3.15.2. Obilježavanje stanica fluorescentnim protutijelima

Nakon blokiranja epitopa, dodano je primarno/sekundarno protutijelo razrijeđeno u 500  $\mu$ l ledeno hladne otopine koja je sadržavala PBS1X uz dodatak 1% BSA i 0,1% natrijevog azida. Inkubacija je trajala 25 minuta na 4 °C, u mraku, uz miješanje. Protutijela korištena za obilježavanje pojedinih populacija upalnih stanica nalaze se u *Tablici 6*.

*Tablica 6.* Popis protutijela koja su korištena za označavanje upalnih stanica za analizu protočnim citometrom.

Protutijelo	Porijeklo i specifičnost	Razrjeđenje	Tvrka	Kataloški broj
anti-CD45 konjugirano s V500	štakor anti-miš	1:200	BD Horizon	561487
anti-CD11b konjugirano s APC	štakor anti-miš	1:200	BD Pharmingen	553312
anti-BrdU konjugirano sa FITC	anti-miš	1:50	BD Pharmingen	559619 (kit)

Nakon inkubacije sa primarnim/sekundarnim protutijelom uzorci su centrifugirani na 800g, 4°C, 5 minuta. Nakon uklanjanja nadtaloga, uzorci su isprani 2 puta sa 500  $\mu$ l PBS1X uz dodatak 1% BSA i 0,1% natrijevog azida. Nakon ovog koraka nastavlja se BrdU protokol prema uputama proizvođača (BD BrdU flow kit FITC, kat. br. 559619). Protokol se sastojao od osnovnih koraka: fiksiranje i permeabilizacija stanica, permeabilizacija stanica, re-fiksiranje stanica, tretiranje stanica sa DNazom kako bi se eksponirao inkorporirani BrdU, označavanje intracelularnih antigena fluorescentnim protutijelima te resuspendiranje stanica u

puferu za bojenje (1X DPBS, 3% toplinom inaktivirani FBS, 0.09% natrijev azid) u polistirenskim epruветama sa zaobljenim dnom.

### **3.15.3. Protočna citometrija i strategija razvrstavanja stanica**

Uzorci su analizirani na protočnom citometru (BD LSRII) neposredno nakon završetka protokola označavanja stanica. Analiza je izvršena od strane osobe koja nije bila informirana o pokusnim skupinama niti vremenskim točkama, a uzorci su bili nasumično označeni rednim brojevima. Stanice su najprije bile sortirane korištenjem prednjeg i postraničnog raspršenja (engl. *front scatter* – *FSC* i *side scatter* – *SSC*) kako bi se uklonile lažno pozitivno označene čestice (mrtve stanice, komadi staničnih membrana itd.). Daljnje razvrstavanje provedeno je pomoću postraničnog raspršenja (*SSC*) i dobivenog *CD45* signala kako bi se odabrala populacija upalnih stanica. Uslijedila je analiza korištenjem dvije boje (engl. *two-color analysis*), za anti-*CD11b* i anti-*CD45*, kako bi se razgraničile populacije stanica mikroglije (*CD45<sup>niski</sup>/CD11b<sup>+</sup>*) i stanica nalik na makrofage (*CD45<sup>visoki</sup>/CD11b<sup>+</sup>*), kao što je prethodno opisano (88, 89).

Procjena mikroglijalne proliferacije provedena je korištenjem analize protutijela obilježenim sa tri različite boje: anti-*CD45-V500*, anti-*CD11b-APC* i anti-*BrdU-FITC*. Kontrolnu skupinu za analizu procjene broja proliferirajućih stanica činile su stanice mozga miševa koji nisu bili podvrgnuti *MCAO*, niti su primali intraperitonealne injekcije *BrdU*. U oba slučaja, kod određivanja broja stanica, kao i proliferacije stanica vrijednosti su bile izražene kao postotak *CD45* pozitivnih stanica, kako bi se isključile lažno pozitivne čestice (stanični debris i sl.).

### **3.16. Metoda oslikavanja izražaja molekula u stvarnom vremenu - *in vivo* bioluminiscencija**

Za selektivno prikazivanje aktiviranih mikroglijalnih stanica prisutnih u mozgu živih miševa nakon ishemijske ozljede, korištena je transgениčna mišja linija *TLR2/luc/gfp.*, koja pod promotorom za gen *Tlr2* sadrži dvostruki bicistranski reporterski sustav: luciferazu (*luc*) i zeleni fluorescentni protein (*gfp*) (162). Mjerenjem intenziteta bioluminiscencije, proučavan

je izražaj *Tlr2* u miševa sa onemogućenim *Gal-3* genom u usporedbi sa miševima divljeg tipa. Stoga, korištene se dvije skupine miševa, obje sa dvostrukim reporterskim sustavom pod kontrolom *Tlr2* promotora: miševi sa prisutnim *Gal-3* genom (*Gal-3*<sup>+/+</sup> *Tlr2/luc/gfp*) i miševi sa onemogućenim *Gal-3* genom (*Gal-3*<sup>-/-</sup> *Tlr2/luc/gfp*). Oslikavanje bioluminiscencije *in vivo* provedeno je prije izazivanja ishemijske lezije, te u vremenskim točkama 1, 2, 3, 5 i 7 dana nakon MCAO. Mjerenje bioluminiscentnog signala provedeno je najprije na kontrolnim životinjama (1 dan prije MCAO) kako bi se odredila bazalna vrijednost signala.

Oslikavanje bioluminiscencije provedeno je pomoću IVIS<sup>®</sup> 200 sustava oslikavanja (Perkin Elmer, CaliperLS-Xenogen, Alameda, CA, SAD), prema prethodno opisanom protokolu (160, 162). Ukratko, 25 minuta prije samog oslikavanja miševima je intraperitonealno injiciran D-luciferin (150 mg/kg tjelesne težine; priprema: D-luciferin kalijeva je sol u prahu otopljena u fiziološkoj otopini (0.9% NaCl) do konačne koncentracije 15 mg/ml, alikvoti su potom smrznuti i čuvani zaštićeni od svjetlosti na -80 °C). Injicirani volumen iznosio je 10 µl/g tjelesne težine. Kako bi se isključila varijabilnost, uvijek je korišten D-luciferin od istog proizvođača.

Neposredno prije početka oslikavanja miševi su anestetizirani u indukcijskoj komori sa 2% izofluranom u 100% kisiku (2L/min). Budući da crna boja mišjeg krzna (pigment melanin) apsorbira dio svjetlosnog spektra iznad 600 nm i raspršuje signal, krzno je uklonjeno električnim brijačim aparatom sa područja lubanje. Miševi su potom premješteni u IVIS<sup>®</sup> 200, sustav za oslikavanje bioluminiscencije, gdje su položeni na grijanu podlogu u potrbušnom položaju, sa njuškom u otvoru kroz koji je dotjecao inhalacijski anestetik (2% izofluran u 100% kisiku, 1L/min). Budući da je u navedenom mišjem modelu prethodno uočen ektopični, konstitutivno visoki intenzitet bioluminiscentnog signala koji dopire iz područja uški, navedeno područje je pokriveno crnim papirom kako bi analiza intenziteta signala bila olakšana, budući da program automatski određuje raspon intenziteta prema najjačem izmjerenom intenzitetu, što bi bez pokrivanja područja zahtjevalo naknadne korekcije (160). Mjerenje bioluminiscentnog signala provedeno je pomoću CCD kamere visoke osjetljivosti i rezolucije kojom su zabilježene emitirane valne duljine između 300 i 660 nm. Vrijeme ekspozicije bilo je 2 minute, na području 4 x 4 cm, pomoću visokog stupnja zapremanja informacija o rezoluciji, te visoke osjetljivosti (engl. *high binning*), uz aperturu leće f/1. Emitirana bioluminiscencija normalizirana je i kvantificirana u jedinicama

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

### **3.17. Neurološka procjena miševa**

Prije i nakon izazivanja ishemijske ozljede mozga, miševi su bili podvrgnuti procjeni neurološkog statusa. Vremenske točke u kojima je izvršena procjena bile su: jedan dan prije operacije, neposredno nakon operacije, te 3, 5, 7, 14, 21 i 28 dana nakon operacije. Procjena se vršila prema uvriježenoj metodi prema (175). Aktivnost se ocjenjivala prema parametrima navedenima u *Tablici 7* ocjenama od 0 do 3. Najveći mogući broj bodova iznosio je 18, što odgovara zdravoj životinji, a najmanji mogući rezultat iznosio je 3.

Spontana aktivnost ocjenjena je u trajanju od 5 minuta u, za miša, normalnom okruženju (kavezu). Proučavana je spontana aktivnost prilikom istraživanja prostora. Tom prilikom ispitivač se nije pokretao, niti proizvodio buku kako ne bi ometao miša i uzrokovao "smrzavanje", tj. karakteristično ponašanje miša u kojemu se on zaustavi i ukoči, a javlja se u situacijama kada se životinja osjeća ugroženom. Simetrija pokretanja svih udova izvedena je na način da se miša drži u zraku, pridržavajući ga samo za rep. Svi udovi u zdrave životinje bili su ispruženi, a posebna pozornost posvećena je pokretanju udova desne strane. Simetrija ispruženosti prednjih udova izvedena je na način da miša držimo u zraku, pridržavajući ga za rep, polagano ga spuštamo do podloge (rub stola), te mu omogućujemo hod na prednjim udovima. Zdrava životinja je u potpunosti simetrično ispružila prednje udove i hodala na njima. Penjanje po zidu žičanog kaveza provedeno je na način da je poklopac kaveza postavljen pod kutem od gotovo 90 stupnjeva, a miš je postavljen na donju 1/3 poklopca. U toj situaciji miš se nastojao popeti do vrha, što nam je omogućilo promatranje pokreta penjanja. Propriocepcija je ispitivana na način da je životinja dodirnuti sa tupim štapićem sa jedne, a potom i s druge strane tijela. Tipičan odgovor zdrave životinje uključivao je okretanje glave i pokret cijelog tijela prema štapiću, s ciljem proučavanja i njuškanja štapića.



Životinja sa neurološkim ispadom zanemarivala je jednu stranu tijela, a navedeni odgovor izostajao je na desnoj strani prilikom dodira štapićem. Odgovor na dodir brkova izveden je na način da se tupim štapićem dodiruju brkovi na obje strane. Dodir brkova je izveden na način da je štapić pružen odostraga kako miš ne bi vidio štapić, već bi imao isključivo dodirni stimulus. Zdrava životinja pomicala je brkove na dodir i okrenula je glavu u smjeru podražaja, a ponekad i pomaknula cijelo tijelo, sve s ciljem istraživanja i njuškanja, dok je kod životinje koja ima neurološki ispad ta reakcija izostala.

Tablica 7. Neurološka procjena - pregled testova i bodovanje (175).

Test:	Bodovi:			
	0	1	2	3
<b>Spontana aktivnost u periodu od 5 minuta</b>	Nema spontanih pokreta	Slaba aktivnost	Dodiruje manje od 3 strane kaveza	Dodiruje barem 3 strane kaveza
<b>Simetrija pokreta (sva četiri uda)</b>	Nema pokreta na desnoj strani	Slabi pokreti na desnoj strani	Desna strana se sporije pomiče	Obje strane se kreću simetrično
<b>Simetrija ispruženosti prednjih udova kada se miša drži za rep</b>	Nema pokreta ispružanja prednjeg desnog uda	Slabi pokreti ispružanja prednjeg desnog uda	Slabi pokreti ispružanja desnog uda u odnosu na lijevi	Simetrično ispružanje prednjih udova
<b>Penjanje po žičanom zidu kaveza</b>	-	Ne uspijeva se popeti	Desna strana je slaba	Normalno penjanje
<b>Odgovor na dodir trupa s obje strane</b>	-	Nema odgovora na desnoj strani	Slab odgovor na desnoj strani	Simetrični odgovor
<b>Odgovor na podražaj brkova s desne strane</b>	-	Nema odgovora na desnoj strani	Slab odgovor na desnoj strani	Simetrični odgovor

### 3.18. Plan istraživanja sa prikazanim brojem korištenih miševa

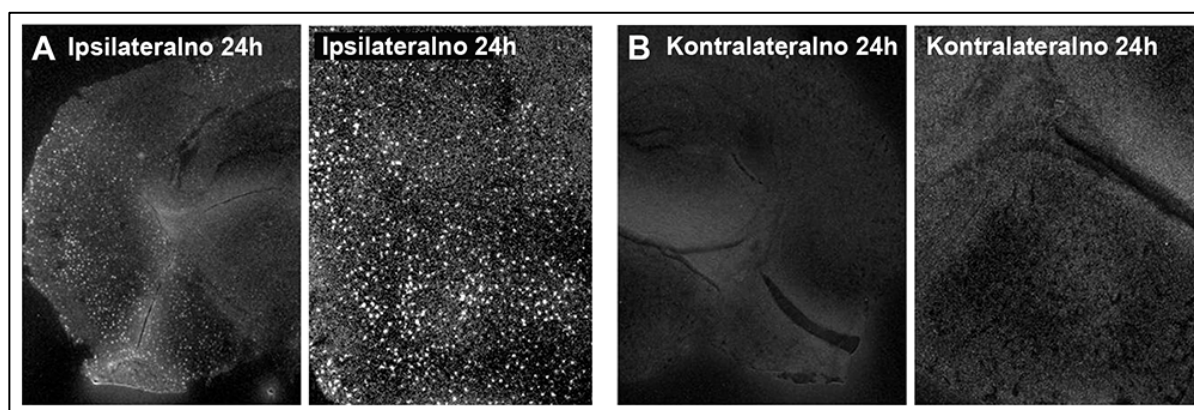
Tablica 8. Plan istraživanja sa navedenim brojem životinja i genotipom. Crvena i plava polja – postupci u kojima su korišteni paralelni rezovi mozga. Plava polja - korišteno je 10 *WT* i 10 *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa. Crvena i zelena polja - injiciran BrdU. (IOD - integrirana optička gustoća).

Postupak	Vremenski period nakon MCAO					
	Kontrola	1 dan	3 dana	4 dana	7 dana	14 dana
Hibridizacija RNA <i>in situ</i>		3 <i>WT</i>				
TLR2 kolok. sa biljezima st. populacija			2 <i>WT</i> 2 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		2 <i>WT</i> 2 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	2 <i>WT</i> 2 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>
Iba1 IOD	4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	
CD68 IOD	4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	
Profil citokina Raybiotech®		4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		
Protočna citometrija	4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	
Broj CD3 <sup>+</sup> stanica	4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	
BrdU IOD	4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>			
BrdU kolokalizacija	2 <i>WT</i> 2 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		2 <i>WT</i> 2 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>			
Mac2 IOD	4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>			
Mac2 kolokalizacija	2 <i>WT</i> 2 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		2 <i>WT</i> 2 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>			
Mjerenje bioluminiscencije <i>in vivo</i>	10 <i>Tlr2/luc/gfp Gal3</i> <sup>-/-</sup> i 10 <i>Tlr2/luc/gfp Gal3</i> <sup>WT</sup> miševa u 0, 1, 2, 3, 5 i 7 dana nakon MCAO; 3 x 10 <i>Tlr2/luc/gfp</i> 0, 6h, 1, 2, 3, 7 dana nakon MCAO (dijetni režimi)					
Procjena veličine ishemijske lezije			10 <i>WT</i> 10 <i>TLR2</i> <sup>-/-</sup>		10 <i>WT</i> 10 <i>TLR2</i> <sup>-/-</sup>	10 <i>WT</i> 10 <i>TLR2</i> <sup>-/-</sup>
Procjena veličine ishemijske lezije (dijetni režimi)		3 x 7 <i>WT</i> (2 dana)			3 x 7 <i>WT</i>	
Broj cijepana kaspaza-3 poz. st.	4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>
cijepana kaspaza-3 kolokalizacija	2 <i>WT</i> 2 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		2 <i>WT</i> 2 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		2 <i>WT</i> 2 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	2 <i>WT</i> 2 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>
IGF-1 IOD	4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	
IGF-1 kolokalizacija	2 <i>WT</i> 2 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		2 <i>WT</i> 2 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		2 <i>WT</i> 2 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	
GFAP IOD	4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>		4 <i>WT</i> 4 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	
Neurološka procjena	6 <i>WT</i> i 6 <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup> miševa u vremenskim točkama 0, 3, 5, 7, 10, 14, 21 i 28 dana nakon MCAO					

## 4. REZULTATI

### **4.1. Stanice mikroglije/makrofazi pojačano izražavaju TLR2 u odgovoru mozga na ishemijsko oštećenje**

Kako bismo prikazali indukciju izražaja *Tlr2* prilikom odgovora mozga na ishemijsku leziju, proveden je postupak hibridizacije RNA *in situ*, 24 sata nakon postupka okluzije srednje moždane arterije.



---

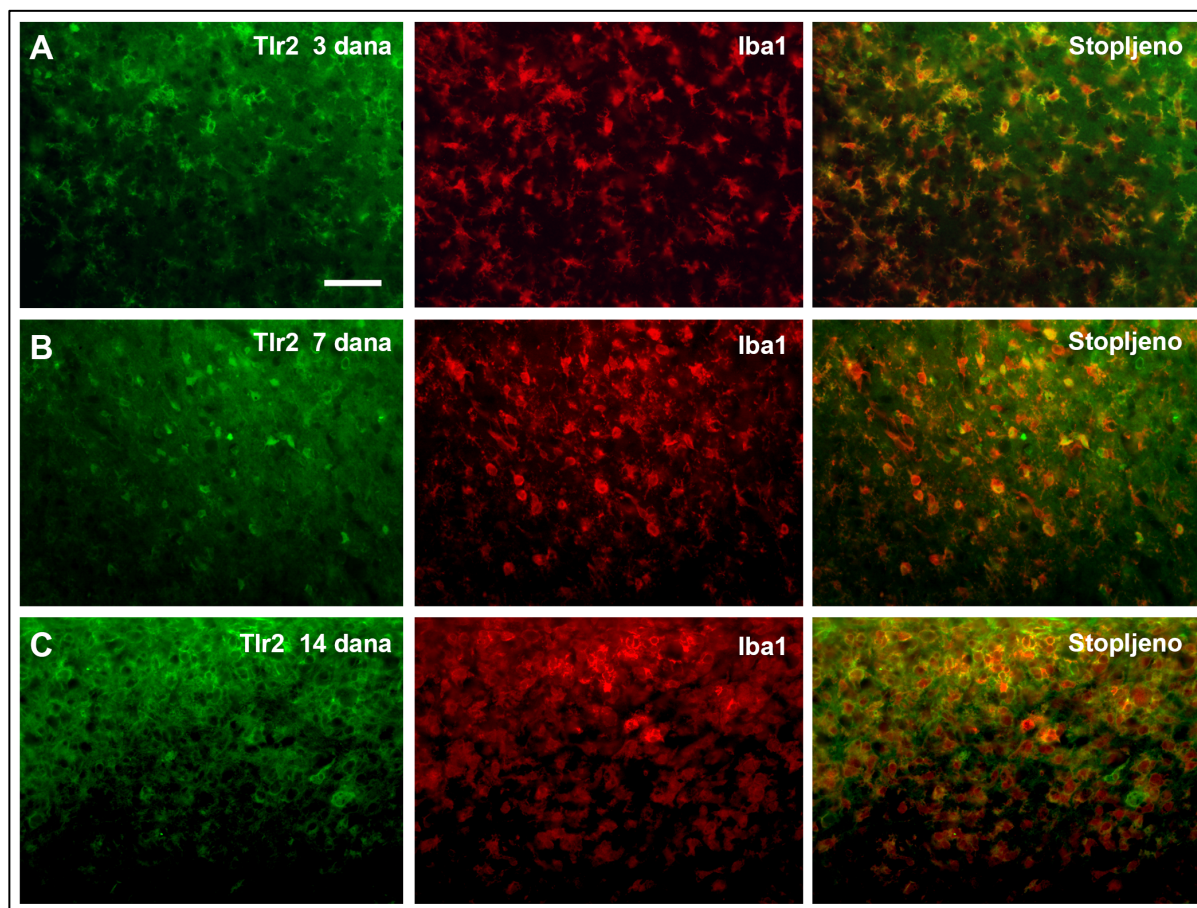
*Slika 11.* Hibridizacija RNA *in situ* za TLR2 mRNA na presjeku mozga miša divljeg tipa 24 sata nakon MCAO. Na ipsilateralnoj strani vidljiva je snažna indukcija TLR2 mRNA u odnosu na kontralateralnu stranu gdje je izražaj ispod razine detekcije. (A i B) lijevo: prikazano slabije povećanje – objektiv 4x, desno: jače povećanje – objektiv 20x.

---

U skladu s prethodnim istraživanjima (152, 153, 168), 24 sata nakon okluzije srednje moždane arterije uočena je značajna indukcija TLR2 mRNA u području ishemijske lezije kao i u peri-infarktnom području, što je na prikazanoj *Slici 11.* vidljivo kao područje s izrazito pozitivnim S<sup>35</sup> signalom. Kontralateralna strana (bez ishemijske lezije) vidljiva je kao područje u kojemu nije prisutan pozitivan signal, tj. razina TLR2 mRNA je iznimno niska, ispod razine detekcije, što je karakteristično za fiziološke uvjete.

S ciljem određivanja populacije stanica koje izražavaju TLR2 nakon MCAO, provedena je metoda dvostrukog imunofluorescentnog obilježavanja tkiva korištenjem protutijela koja se

specifično vežu na TLR2 u kombinaciji s protutijelima specifičnim mikrogliju/makrofage – Iba1 u vremenskim točkama 3, 7 i 14 dana nakon MCAO (*Slika 12*).

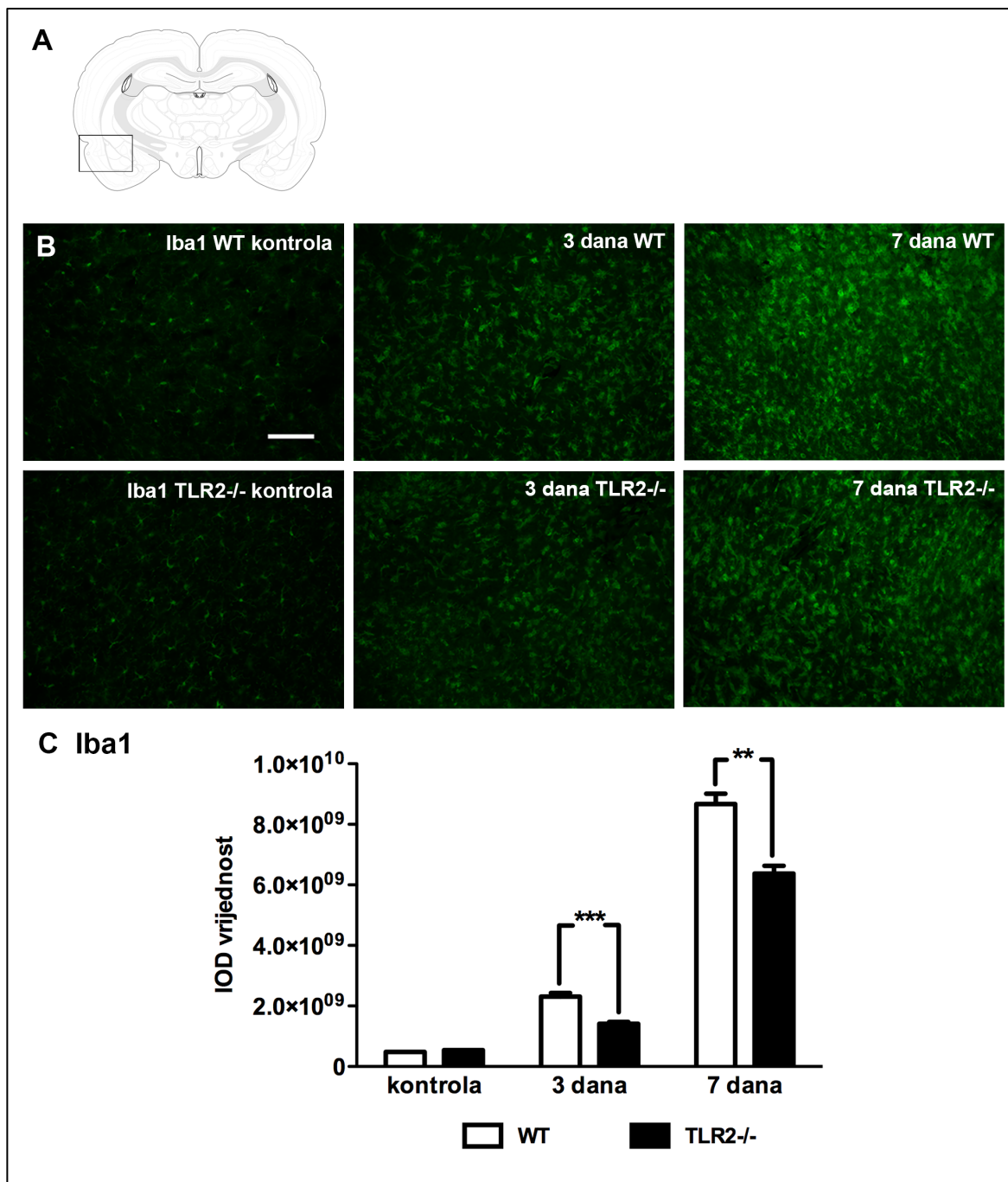


*Slika 12.* Dvostruko imunofluorescentno obilježavanje s TLR2 protutijelom (zeleno) u kombinaciji sa Iba1 (mikroglija/makrofazi) protutijelom 3 (A), 7 (B) i 14 dana (C) nakon MCAO. Mjerna oznaka: 50  $\mu$ m.

Uz navedeni izražaj, provjeren je i izražaj na astrocitima, te neuronima, međutim nije uočena kolokalizacija uporabom navedenih protutijela. Analiza rezultata ukazuje kako je TLR2 izražen gotovo isključivo na stanicama mikroglije/ makrogafa - Iba1 pozitivnim stanicama, kako u ranoj fazi odgovora na ishemijsku leziju - 3 dana, tako i u kasnijim fazama odgovora (7 i 14 dana) nakon izazivanja ishemijsko-reperfuzijske ozljede mozga.

#### **4.2. Promijenjeni aktivacijski profil stanica mikroglije/makrofaga u miševa s onemogućenim *Tlr2* genom**

Stanice mikroglije glavne su izvršne stanice prirodnog upalnog odgovora, a aktiviraju se vezanjem DAMP liganada, oslobođenih uslijed oštećenja stanica, na porodicu TLR receptora. Aktivacija stanica mikroglije u odgovoru na ishemijsku leziju ovisi velikim dijelom o aktivaciji TLR2 receptora. Do danas, nije jasno utječe li TLR2 na aktivacijski profil mikroglijalnih stanica u ranoj i kasnoj fazi (3 i 7 dana) nakon nastanka ishemijske ozljede, i ako da, na koji način. Kako bismo odgovorili na postavljeno pitanje, analizirana je aktivacija stanica mikroglije/makrofaga u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom, kao i u skupini miševa divljeg tipa. Kao kontrolna skupina poslužila je skupina miševa koji nisu bili podvrgnuti operacijskom zahvatu. Najprije je analiziran izražaj biljega aktivacije mikroglije/makrofaga, *Iba1* (*Slika 13*). Analiza je bila izvršena mjerenjem integrirane optičke gustoće kao što je opisano u odjeljku 3.12.



*Slika 13.* Analiza aktivacijskog profila mikroglijalnih stanica *Tlr2*<sup>-/-</sup> i *WT* miševa pomoću anti-Iba1 protutijela. A: Shematski prikaz presjeka moždanog tkiva koji je bio korišten za imunohistokemijske postupke, kao i za procjenu izražaja biljega pomoću određivanja integrirane optičke gustoće dobivenog signala. Pravokutnik označava područje koje je korišteno za prikaz imunoreaktivnosti na slikama 14, 17, 18, 20, i 23-27. B: Reprezentativni prikazi Iba1 imunoreaktivnosti u kontrolnoj skupini (bez MCAO), te 3 i 7 dana nakon MCAO u *Tlr2*<sup>-/-</sup> i *WT* miševa. Uočava se smanjena gustoća Iba1 pozitivnih stanica u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa.

C: Kvantitativna analiza Iba1 imunoreaktivnosti ukazuje na smanjenu imunoreaktivnost u skupini *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa 3 i 7 dana nakon MCAO u usporedbi sa *WT* miševima. IOD – integrirana optička gustoća izražena u arbitrarnim jedinicama. Vrijednosti prikazuju srednju vrijednost ± SEM (n=4; \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.0001). Mjerna oznaka: 100 μm.

Imunofluorescentno obilježavanje Iba1 protutijelom ukazalo je na značajnu indukciju signala na ipsilateralnoj strani mozga. Relativna indukcija signala (u usporedbi sa "intaktnom", kontrolnom skupinom, kao i kontralateralnom) uočena je i kod miševa s onemogućenim *Tlr2* genom. Usporedba intenziteta mikroglijalne aktivacije nakon ishemijske ozljede mozga ukazala je na statistički značajno smanjenu jačinu signala kod miševa s onemogućenim *Tlr2* genom u usporedbi sa miševima divljeg tipa u obje vremenske točke, 3 i 7 dana nakon MCAO.

Tablica 9. Kvantitativna analiza intenziteta Iba1 imunofluorescentnog signala. Vrijednosti su izražene u arbitrarnim jedinicama.

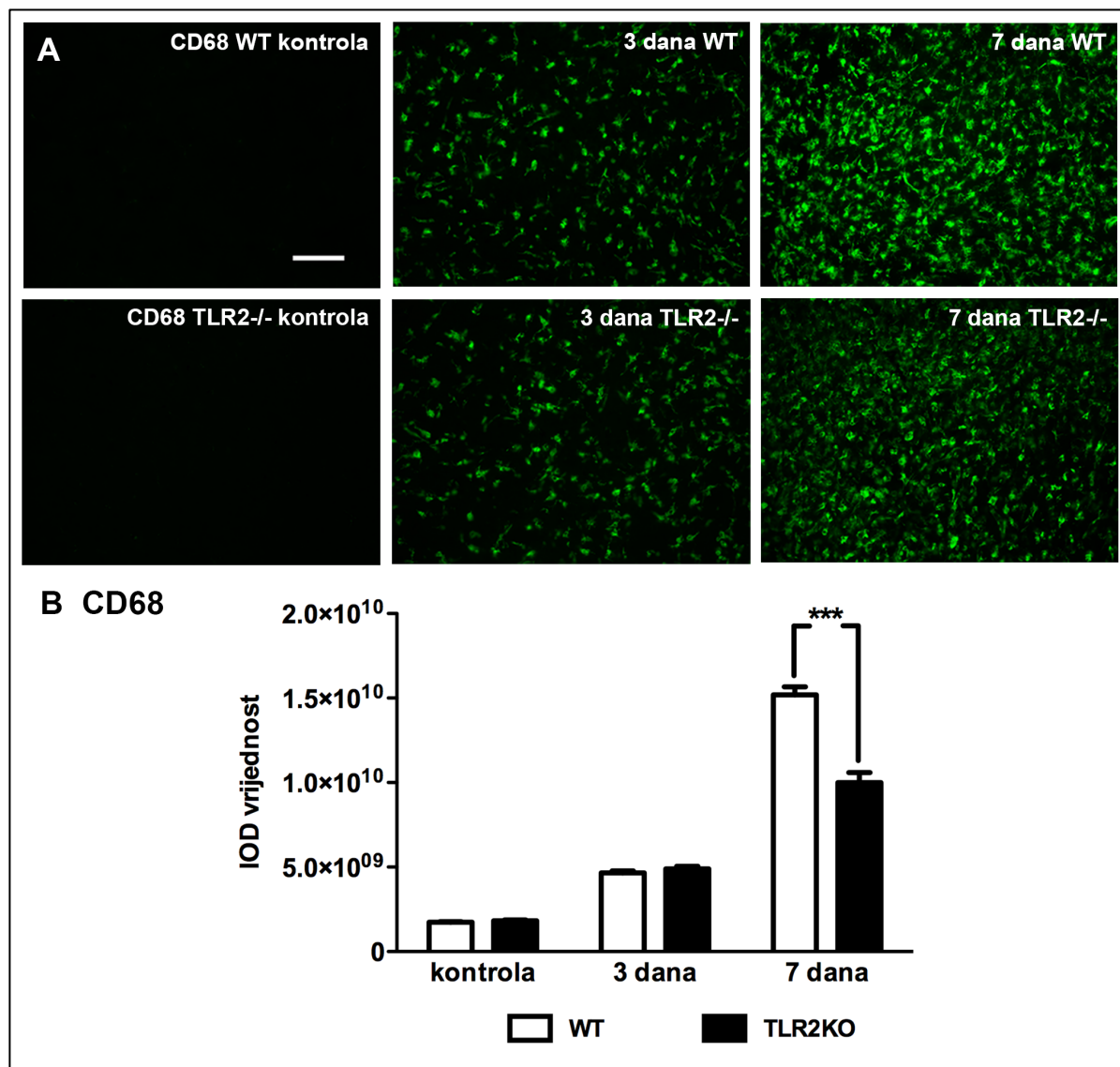
	<i>WT</i>	<i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	p-vrijednost
kontrola	0.48 X 10 <sup>9</sup> ± 0.16 X 10 <sup>9</sup>	0.54 X 10 <sup>9</sup> ± 0.06 X 10 <sup>9</sup>	p=0.438
3 dana	2.31 X 10 <sup>9</sup> ± 0.12 X 10 <sup>9</sup>	1.41 X 10 <sup>9</sup> ± 0.06 X 10 <sup>9</sup>	***p<0.001
7 dana	8.67 X 10 <sup>9</sup> ± 0.34 X 10 <sup>9</sup>	6.37 X 10 <sup>9</sup> ± 0.26 X 10 <sup>9</sup>	**p=0.002

Kvantitativna analiza signala dobivenog označavanjem anti-Iba1 protutijelom pokazala je statistički značajno smanjenje intenziteta signala kod miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom - 1,63 puta slabiji intenzitet 3 dana nakon i 1,36 puta slabiji intenzitet 7 dana nakon MCAO, u usporedbi sa miševima divljeg tipa (Tablica 9 i Slika 13). Navedeni rezultati prikazuju kako je mikroglijalna aktivacija u ranoj i kasnoj fazi nakon nastanka ishemijskoga oštećenja ovisna o prisutnosti funkcionalnog TLR2 receptora.

Prilikom nastanka ishemijske lezije dolazi do odumiranja velikog broja stanica čije ostatke fagocitiraju aktivirane stanice mikroglije/makrofaga, s ciljem stvaranja mikrookoliša koji pridonosi smanjenju upale, te posljedično ograničenju lezije i stvaranju glijalnog ožiljka. Budući da je uočena smanjena aktivacija stanica mikroglije u miševa sa onemogućenim *Tlr2*



genom, provedena je analiza imunofluorescentnog obilježavanja anti-CD68 protutijelom, koje specifično obilježava makrosijalin, membranski protein udružen sa lizosomima, uglavnom kasnim endosomima. Intenzitet imunofluorescentnog obilježavanja sa anti-CD68 protutijelom odražava broj prisutnih fagosoma te stoga omogućava uvid u opseg fagocitotske aktivnosti prisutne u području ishemijske lezije. Analiza je provedena na rezovima mozgovna miševa s onemogućenim *Tlr2* genom i miševa divljeg tipa, 3 i 7 dana nakon MCAO (Slika 14).



Slika 14. Analiza aktivacijskog profila mikroglijalnih stanica *Tlr2*<sup>-/-</sup> i *WT* miševa pomoću anti-CD68 protutijela. A: Reprezentativne fotografije CD68 imunoreaktivnosti u kontrolnoj skupini te 3 i 7 dana nakon MCAO u skupinama *Tlr2*<sup>-/-</sup> i *WT* miševa. Uočava se smanjen intenzitet pozitivnog CD68 signala u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa. B: Kvantitativna analiza ukazuje na



smanjenu anti-CD68 imunoreaktivnost u skupini *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa 3 i 7 dana nakon MCAO u usporedbi sa *WT* miševima. Integrirana optička gustoća izražena je u arbitrarnim jedinicama. Vrijednosti prikazuju srednju vrijednost ± SEM (n=4; \*\*\*p<0.0001). Mjerna oznaka: 100 μm.

Rezultati dobiveni analizom imunofluorescentnog signala anti-CD68 protutijelom pokazuju sličan obrazac uočen kod obilježavanja anti-Iba1 protutijelom. Kao što je prikazano na *Slici 14 B i Tablici 10*, kvantitativna analiza intenziteta CD68 signala pokazuje kako u vremenskoj točki 3 dana nakon MCAO ne postoji statistički značajna razlika u intenzitetu signala između miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom i miševa divljeg tipa. Međutim, u vremenskoj točki 7 dana nakon MCAO analiza intenziteta imunofluorescentnog signala ukazala je na statistički značajno smanjenje intenziteta signala kod miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom – 1,52 puta, u odnosu na intenzitet signala izmjeren kod miševa divljeg tipa (*Slika 14, Tablica 10*).

*Tablica 10.* Kvantitativna analiza intenziteta CD68 imunofluorescentnog signala. Vrijednosti su izražene u arbitrarnim jedinicama.

	<i>WT</i>	<i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	p-vrijednost
kontrola	1.73 X 10 <sup>9</sup> ± 0.36 X 10 <sup>9</sup>	1.83 X 10 <sup>9</sup> ± 0.48 X 10 <sup>9</sup>	p=0.258
3 dana	4.65 X 10 <sup>9</sup> ± 0.13 X 10 <sup>9</sup>	4.90 X 10 <sup>9</sup> ± 0.15 X 10 <sup>9</sup>	p=0.265
7 dana	15.19 X 10 <sup>9</sup> ± 0.47 X 10 <sup>9</sup>	9.99 X 10 <sup>9</sup> ± 0.60 X 10 <sup>9</sup>	***p<0.001

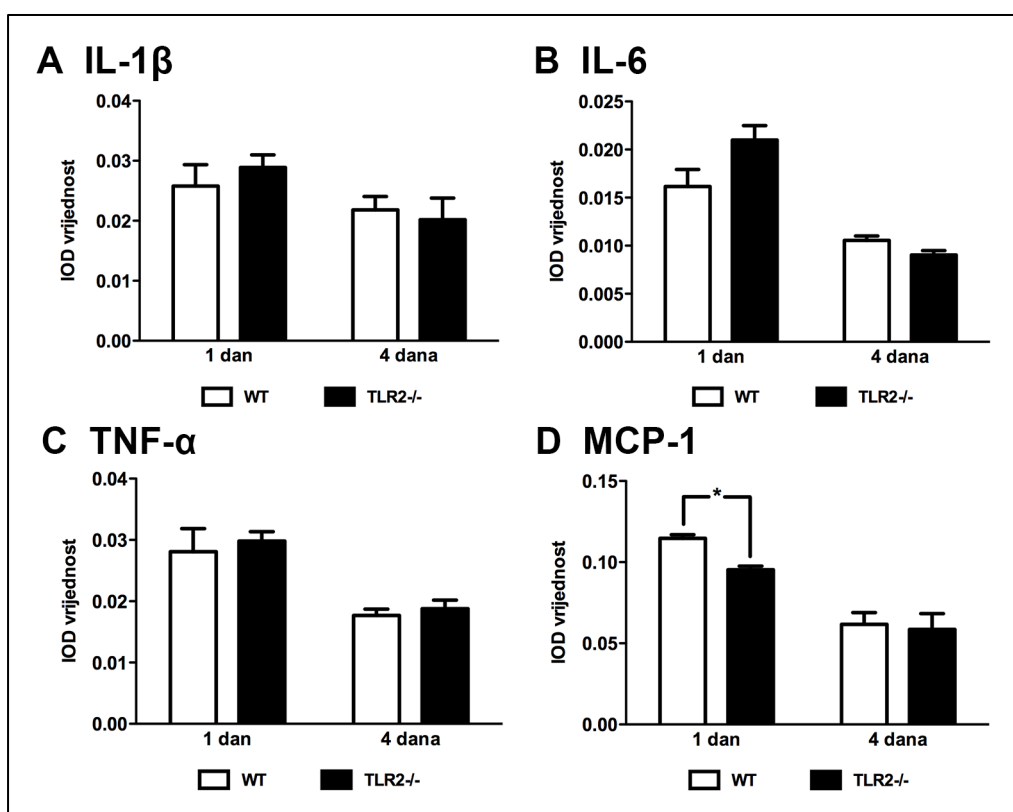
#### 4.3. Smanjena razina kemokina MCP-1 i smanjeni broj CD45<sup>visoki</sup>/CD11b<sup>+</sup> stanica u mozgu miša sa onemogućenim *Tlr2* genom nakon MCAO

Proupalni citokini kao što su interleukini IL-1β i IL-6, te TNFα utječu na opseg neuronalnog oštećenja uslijed ishemijske ozljede mozga (3, 45). Budući da su stanice mikroglije najvažniji izvor upalnih citokina, nameće se pitanje je li uočeni uzorak oslabljene aktivacije mikroglije/makrofaga u miševa s onemogućenim *Tlr2* genom udružen s eventualnim promjenama izražaja upalnih citokina ili kemokina. Kako bismo odredili razinu izražaja upalnih citokina koristili smo membrane koje sadrže protutijela na 40 različitih upalnih

citokina miša (RayBio Mouse Inflammation Antibody Array) (65, 89). Budući da je proizvodnja upalnih citokina najveća 24 sata nakon MCAO, uz iznimku TGF- $\beta$ , čije su vrijednosti najviše 4 dana nakon nastanka ishemijske lezije, te smo dvije vremenske točke koristili za analizu izražaja upalnih citokina (176).

*Tablica 11.* Kvantitativna analiza intenziteta signala citokina IL-1 $\beta$  i IL-6 i TNF $\alpha$ , te kemokina MCP-1 na Raybiotech membranama. Vrijednosti su izražene u arbitrarnim jedinicama.

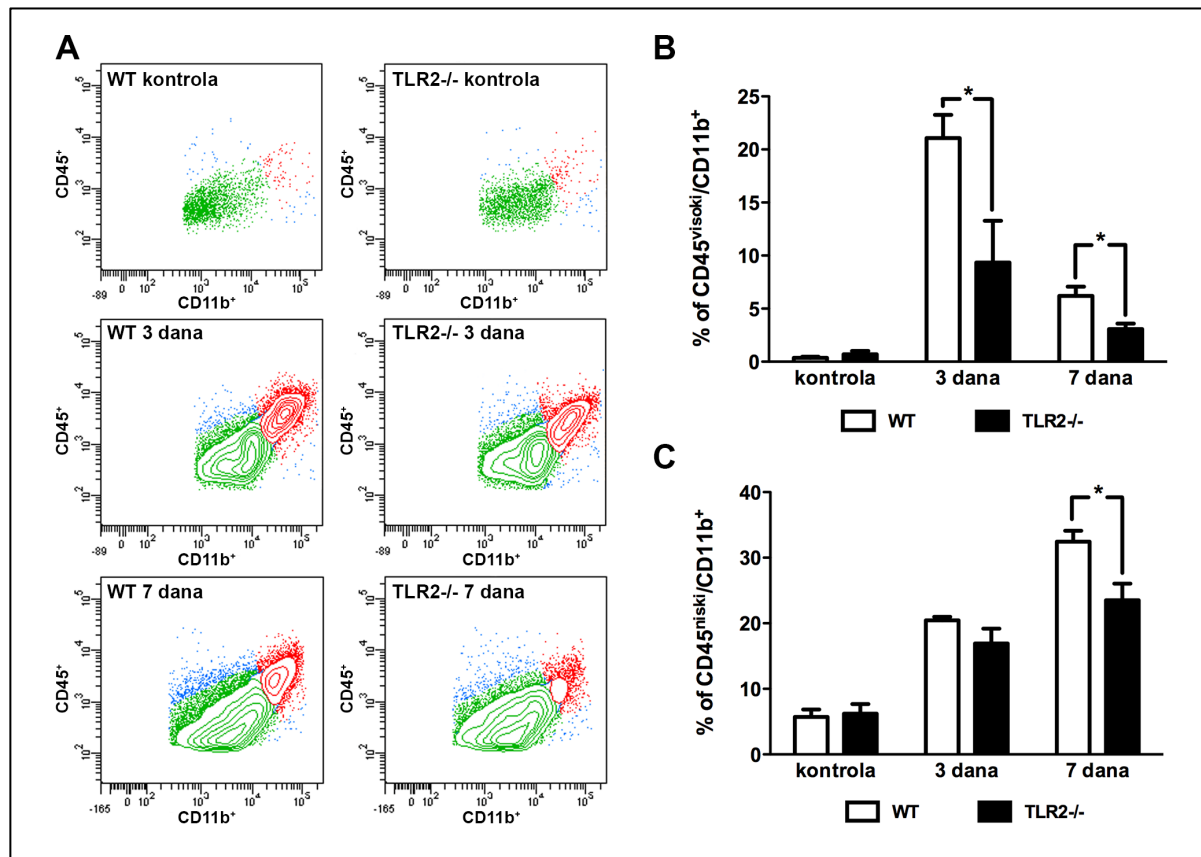
	<i>WT</i>	<i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	p-vrijednost
<b>IL-1<math>\beta</math></b>			
1 dan	0.026 $\pm$ 0.004	-/- 0.029 $\pm$ 0.002	p=0.602
4 dana	0.218 $\pm$ 0.002	0.202 $\pm$ 0.004	p=0.700
<b>IL-6</b>			
1 dan	0.016 $\pm$ 0.002	0.021 $\pm$ 0.001	p=0.082
4 dana	0.011 $\pm$ 0.001	0.009 $\pm$ 0.001	p=0.058
<b>TNF<math>\alpha</math></b>			
1 dan	0.028 $\pm$ 0.003	0.030 $\pm$ 0.001	p=0.720
4 dana	0.018 $\pm$ 0.001	0.019 $\pm$ 0.001	p=0.535
<b>MCP-1</b>			
1 dan	0.115 $\pm$ 0.002	0.095 $\pm$ 0.002	*p=0.026
4 dana	0.062 $\pm$ 0.007	0.059 $\pm$ 0.009	p=0.841



Slika 15. Izražaj upalnih citokina nakon ishemijske ozljede mozga u *Tlr2* $^{-/-}$  i *WT* miševa 1 i 4 dana nakon MCAO. A-C: Analiza izražaja upalnih citokina IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  ne pokazuje značajnu razliku između *Tlr2* $^{-/-}$  i *WT* skupine miševa. D: Značajno smanjenje razine kemokina MCP-1 u *Tlr2* $^{-/-}$  miševa u odnosu na *WT* skupinu 1 dan nakon MCAO. Vrijednosti su izražene u arbitrarnim jedinicama. Vrijednosti stupaca su izražene kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM (n=4, \*p<0.05)

Rezultati analize pokazuju kako je ishemijska lezija udružena sa značajnim porastom proizvodnje proupalnih citokina u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom kao i kod miševa divljeg tipa (Tablica 11, Slika 15). Kvantitativna analiza je, iznenađujuće, pokazala kako ne postoji statistički značajna razlika u količini proizvedenih citokina IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  između skupina miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom, u usporedbi sa miševima divljeg tipa (Slika 15). Međutim, kvantitativna analiza pokazala je statistički značajno smanjenu proizvodnju kemokina MCP-1 jedan dan nakon MCAO u *Tlr2* $^{-/-}$  miševa (Tablica 11, Slika 15D).

Budući da je glavna uloga MCP-1 regrutiranje monocita, ali i limfocita T i drugih mononuklearnih upalnih stanica iz cirkulacije kako bi došli na mjesto ozljede (177), najprije smo istražili mogućnost da je upravo infiltracija monocita na mjesto lezije promijenjena u uvjetima onemogućenog *Tlr2* gena. Priznata metoda kojom se može utvrditi broj infiltrirajućih monocita, kao i broj rezidentnih mikroglijalnih stanica, je metoda protočne citometrije s uporabom dva fluorescentno obilježena protutijela, CD45 i CD11b (88, 89).



*Slika 16.* Određivanje broja upalnih stanica prisutnih na mjestu ishemijske lezije metodom protočne citometrije s uporabom CD45 i CD11b protutijela. A: Topografski prikaz izoliranih mononuklearnih stanica iz mozga *Tlr2*<sup>-/-</sup> i *WT* miševa 3 i 7 dana nakon MCAO, kao i u kontrolnom uzorku (bez MCAO). Analiza stanica sa dva protutijela omogućava razlikovanje dvije populacije stanica: stanica nalik na makrofage - CD45<sup>visoki</sup>/CD11b<sup>+</sup> (crveno) i rezidentnih stanica mikroglije CD45<sup>niski</sup>/CD11b<sup>+</sup> (zeleno). B: Kvantitativna analiza broja stanica nalik na makrofage prikazuje smanjen broj stanica 3 i 7 dana nakon MCAO u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa. C: Kvantitativna analiza broja rezidentnih stanica mikroglije prikazuje značajno smanjenje broja mikroglijalnih stanica 7 dana nakon MCAO u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa. Vrijednosti su izražene kao % CD45<sup>+</sup> događaja ± SEM (n=4; \*p<0.05).

*Slika 16A* predstavlja topografski prikaz broja CD45<sup>visoki</sup>/CD11b<sup>+</sup> (stanice nalik na makrofage – engl. *macrophage-like cells*) i CD45<sup>niski</sup>/CD11b<sup>+</sup> (stanice mikroglije) u kontrolnim uzorcima (hemisfere bez ishemijske lezije), kao i u uzorcima moždanih hemisfera sa prisutnom ishemijskom lezijom 3 i 7 dana nakon MCAO u skupinama miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom i miševa divljeg tipa.

*Tablica 12.* Broj upalnih stanica prisutnih na mjestu ishemijske lezije (izraženo kao % CD45<sup>+</sup> stanica).

	<i>WT</i>	<i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	p-vrijednost
<b>CD45<sup>visoki</sup>/CD11b<sup>+</sup></b>			
kontrola	0.35 ± 0.12%	0.70 ± 0.30%	p=0.325
3 dana	21.08 ± 2.19%	9.34 ± 3.94%	*p=0.040
7 dana	6.20 ± 0.86%	3.06 ± 0.54%	*p=0.021
<b>CD45<sup>niski</sup>/CD11b<sup>+</sup></b>			
kontrola	5.71 ± 1.15%	6.23 ± 1.47%	p=0.793
3 dana	20.44 ± 0.55%	16.91 ± 2.26%	p=0.137
7 dana	32.44 ± 1.69%	23.55 ± 2.52%	*p=0.026

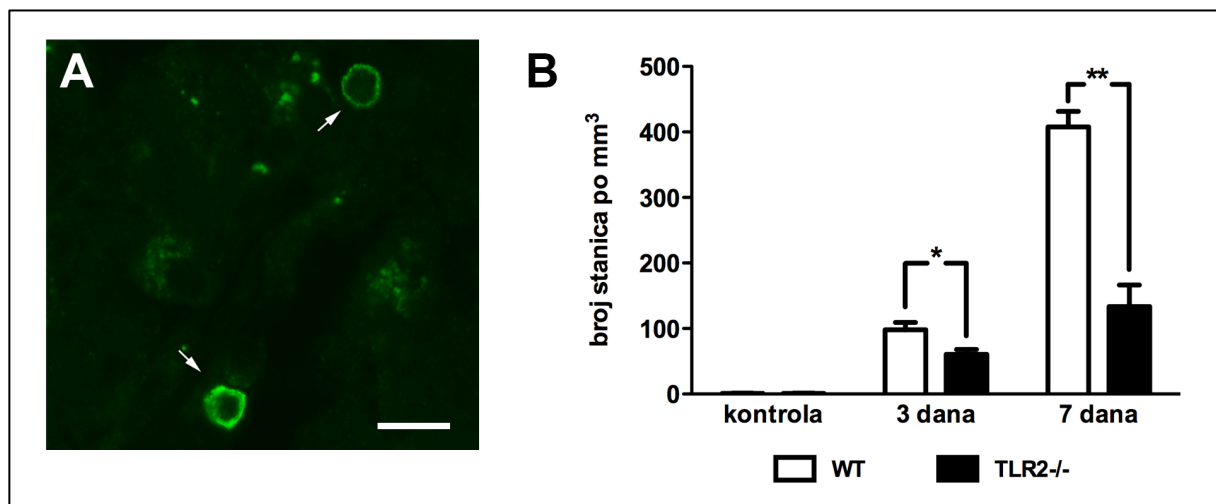
Kvantitativna analiza podataka iz *Tablice 12*, prikazana na *Slici 16B* pokazala je statistički značajno smanjenje broja CD45<sup>visoki</sup>/CD11b<sup>+</sup> stanica - stanica nalik na makrofage, u skupini miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom. Smanjenje je iznosilo 2,26 puta u usporedbi sa brojem stanica prisutnim kod miševa divljeg tipa 3 dana nakon MCAO, te 2,02 puta u usporedbi sa brojem stanica prisutnim kod miševa divljeg tipa 7 dana nakon MCAO.

Sljedeći korak bila je analiza broja rezidentnih stanica mikroglije u miševa s onemogućenim *Tlr2* genom, kao i kod miševa divljeg tipa. Kvantitativna analiza pokazala je smanjenje broja CD45<sup>niski</sup>/CD11b<sup>+</sup> stanica – 1,38 puta u odnosu na broj stanica uočen kod miševa divljeg tipa u ipsilateralnim moždanim hemisferama kod miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom 7 dana nakon MCAO (*Tablica 12* i *Slika 16C*). 3 dana nakon MCAO u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom uočeno je smanjenje broja CD45<sup>niski</sup>/CD11b<sup>+</sup> stanica od 1,21 puta u odnosu na

broj stanica koji je prisutan kod miševa divljeg tipa, ali ona nije bila statistički značajna. Unatoč tome, vidljiva je tendencija smanjenja broja stanica mikroglije 3 dana nakon MCAO, koja se 7 dana nakon MCAO jasno vidi i statistički je značajna. Stoga, uočeno rano i selektivno smanjenje razine MCP-1 zajedno sa smanjenim brojem  $CD45^{\text{visoki}}/CD11b^+$  i  $CD45^{\text{niski}}/CD11b^+$  stanica sugeriraju kako TLR2 ima važnu ulogu u modulaciji regrutiranja monocita/moždanih makrofaga, kao i u regulaciji broja prisutnih mikroglijalnih stanica na mjestu ishemijske lezije.

#### 4.4. Smanjeni broj limfocita prisutnih na mjestu ishemijske lezije u miševa s onemogućenim *Tlr2* genom

Uz prikazani utjecaj na regrutiranje monocita iz cirkulacije, također je opisana uloga kemokina MCP-1 u regrutiranju limfocita iz cirkulacije na mjesto aktivnog upalnog procesa. Budući da je uočena snižena razina kemokina MCP-1, procijenjen je broj prisutnih limfocita T na mjestu ishemijske lezije obilježavanjem stanica protutijelom anti-CD3 (obilježava CD3 kompleks koji je pridružen receptoru limfocita T – TCR) (95).



Slika 17. Usporedba broja  $CD3^+$  stanica (limfocita) prisutnih na području ishemijske lezije u skupini miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom i u skupini miševa divljeg tipa. A: Fotografija prikazuje primjer obilježenog limfocita T anti-CD3 protutijelom. Budući da se radi o malom broju prisutnih  $CD3^+$  stanica, nisu prikazane usporedne slike dviju uspoređivanih skupina

miševa; B: Prikaz broja prisutnih limfocita na mjestu ishemijske lezije u *Tlr2*<sup>-/-</sup> i WT miševa. Mjerna oznaka: 20  $\mu$ m. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ .

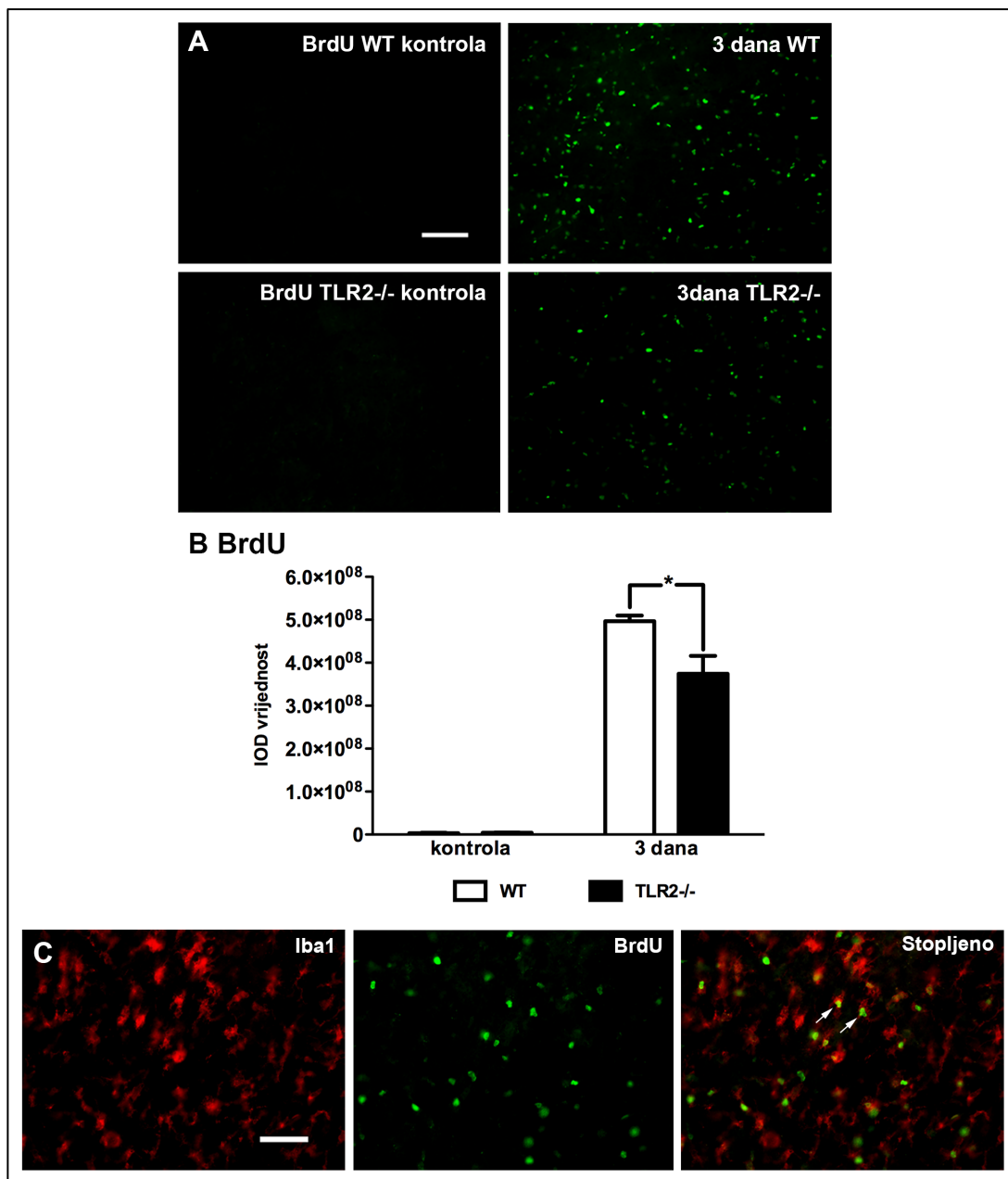
Tablica 13. Prikaz broja CD3 pozitivnih stanica na mjestu ishemijske lezije (u  $\text{mm}^3$ ).

	<i>WT</i>	<i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	p-vrijednost
kontrola	1,01 $\pm$ 0,32	1,01 $\pm$ 0,45	p=1,00
3 dana	98,15 $\pm$ 11,26	60,21 $\pm$ 7,50	*p=0,04
7 dana	407,50 $\pm$ 23,93	133,4 $\pm$ 33,14	**p=0,009

Rezultati prikazani u *Tablici 13* i *Slici 17* prikazuju smanjen broj prisutnih limfocita T na mjestu ishemijske ozljede u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa 3 i 7 dana nakon MCAO. Uočeno smanjenje vjerojatno je posljedica snižene razinu kemokina MCP-1, što posljedično uzrokuje smanjeno regrutiranje limfocita iz cirkulacije u područje lezije.

#### 4.5. Smanjena proliferacija rezidentnih stanica mikroglije u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom nakon ishemijske lezije

Mikroglijalna aktivacija koja nastaje kao dio odgovora mozga na ishemijsku leziju udružena je s masivnom proliferacijom mikroglijalnih stanica, sa vrhuncem između 48 i 72 sata nakon nastanka ozljede (65, 178). Naši rezultati prikazuju smanjen broj mikroglijalnih stanica na mjestu lezije, te u okolnim područjima, međutim, nije jasno je li mikroglijalna proliferacija poremećena kod miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom. Kako bismo odgovorili na to pitanje, *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševi, te miševi divljeg tipa injicirani su bromodeoksiuridinom – BrdU, analogom timidina koji se inkorporira u stanice prilikom njihove proliferacije. Analiza intenziteta fluorescentnog signala dobivenog imunofluorescentnim obilježavanjem sa anti-BrdU protutijelom učinjena je 3 dana nakon MCAO (*Slika 18*).



*Slika 18.* Procjena proliferacijskog kapaciteta stanica u području ishemijske lezije mjerenjem intenziteta obilježavanja anti-BrdU protutijelom. A: Reprezentativne fotografije BrdU imunoreaktivnosti u *WT* i *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa 3 dana nakon MCAO. B: Kvantifikacija intenziteta BrdU signala ukazuje na smanjen proliferacijski kapacitet stanica u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa u usporedbi sa miševima divljeg tipa. C: Reprezentativni prikazi gotovo potpune kolokalizacije BrdU i Iba1 pozitivnih stanica u *WT* miševa, 3 dana nakon MCAO (bijele strelice pokazuju kolokalizaciju). Mjerna oznaka: A: 100  $\mu$ m, C: 50  $\mu$ m.



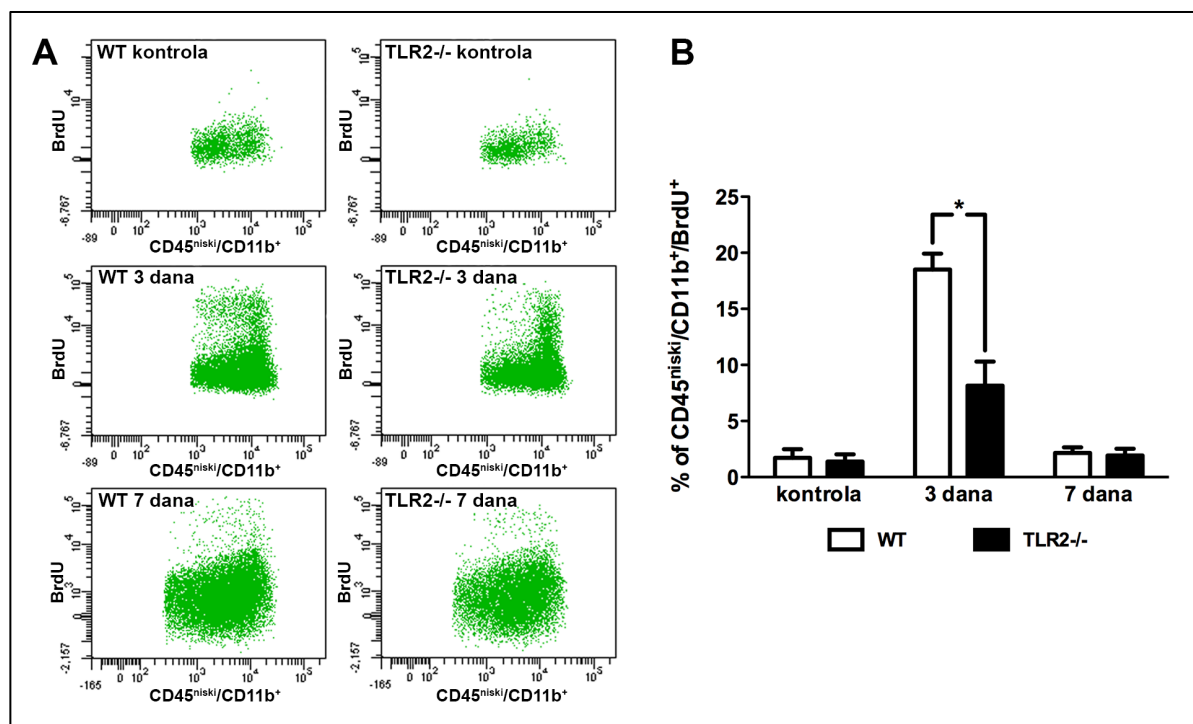
U skladu s prethodnim istraživanjima, u obje skupine miševa uočena je masivna proliferacija mikroglialnih stanica, kao oblik odgovora na nastalu ishemijsku leziju. Međutim, kao što je vidljivo u *Tablici 14* i na *Slici 18A i 18B*, u skupini miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom proliferacija mikroglialnih stanica bila je 24,55 % niža nego kod miševa divljeg tipa.

*Tablica 14.* Kvantitativna analiza intenziteta BrdU imunofluorescentnog signala. Vrijednosti su izražene u arbitrarnim jedinicama.

	<i>WT</i>	<i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	p-vrijednost
kontrola	0.03 X 10 <sup>8</sup> ± 0.01 X 10 <sup>8</sup>	0.04 X 10 <sup>8</sup> ± 0.01 X 10 <sup>8</sup>	p=0.278
3 dana	4,97 X 10 <sup>8</sup> ± 0,13 X 10 <sup>8</sup>	3,75 X 10 <sup>8</sup> ± 0,42 X 10 <sup>8</sup>	*p=0.048

Kako bismo potvrdili pretpostavku da je BrdU zaista izražen u stanicama mikroglije, učinjeno je dvostruko obilježavanje metodom imunofluorescencije uz pomoć protutijela anti-BrdU, te anti-Iba, dakle, biljezima stanične proliferacije i biljegom mikroglije/makrofaga 3 dana nakon MCAO. Rezultati prikazuju kako su gotovo sve stanice pozitivne na BrdU bile također pozitivne i na Iba1, sugerirajući da je mikroglialna proliferacija poremećena u miševa s onemogućenim *Tlr2* genom (*Slika 18C*).

Provedena imunohistokemijska analiza ukazala je na potencijalno smanjeni proliferacijski kapacitet mikroglialnih stanica uočen kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa. Kako bi navedeni rezultati bili potvrđeni, korištena je procjena proliferacije stanica mikroglije metodom protočne citometrije sa korištenjem tri protutijela na *Tlr2*<sup>-/-</sup> i *WT* miševima 3 i 7 dana nakon MCAO (*Slika 19*). Metoda je korištena na način da je sa anti-CD45 i anti-CD11b protutijelima najprije definirana populacija mikroglialnih stanica (CD45<sup>niski</sup>/CD11b<sup>+</sup>). Nakon toga je na navedenoj populaciji analiziran izražaj anti-BrdU protutijela, prema prethodno opisanom protokolu (88, 89).



Slika 19. Analiza proliferacije mikroglijalnih stanica ( $CD45^{niski}/CD11b^+$ ) metodom protočne citometrije. A: Prikaz broja  $CD45^{niski}/CD11b^+/BrdU^+$  stanica 3 i 7 dana nakon ishemijske lezije. B: Kvantitativna analiza dobivenih vrijednosti otkriva smanjeni broj proliferirajućih stanica mikroglije u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa, u odnosu na *WT* miševe u obje vremenske točke. Vrijednosti su izražene kao postotak  $CD45^+$  događaja  $\pm$  SEM (n=4; \*p<0.05).

Tablica 15. Prikaz broja  $CD45^{niski}/CD11b^+/BrDU^+$  stanica na mjestu ishemijske lezije (izraženo kao %  $CD45^{niski}/CD11b^+$  stanica).

	<i>WT</i>	<i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	p-vrijednost
kontrola	1.72 $\pm$ 0.78%	1.39 $\pm$ 0.63%	p=0.762
3 dana	18.51 $\pm$ 1.41%	8.16 $\pm$ 2.14%	*p=0.014
7 dana	2,16 $\pm$ 0,51%	1,94 $\pm$ 0,60	p=0,789

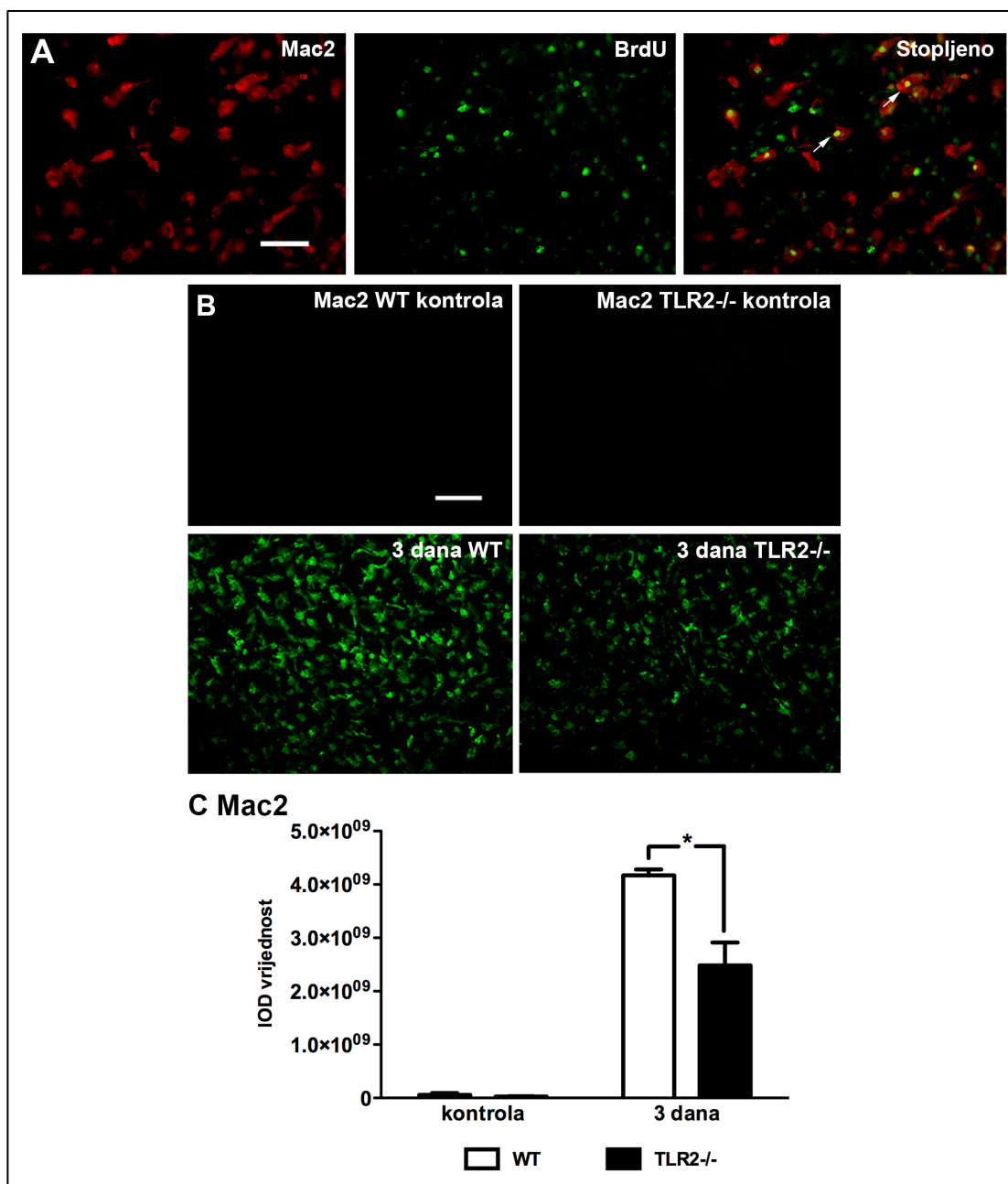
Analiza protočnim citometrom 3 dana nakon nastale ishemijske lezije pokazala je značajan deseterostruki porast broja  $CD45^{niski}/CD11b^+/BrdU^+$  stanica prisutan kod miševa divljeg tipa (Slika 19A). Međutim, kako je prikazano na Slici 19B, u skupini miševa sa onemogućenim

*Tlr2* genom uočen je smanjen broj proliferirajućih mikroglijalnih stanica i to za čak 55,91 % u odnosu na broj proliferirajućih stanica kod miševa divljeg tipa. Broj proliferirajućih mikroglijalnih stanica ( $CD45^{\text{niski}}/CD11b^+/BrDU^+$ ) 7 dana nakon MCAO bio je nizak u obje skupine miševa, bez statistički značajne razlike između skupina (*Tablica 15* i *Slika 19B*).

Galektin-3 (Mac-2) ima mnogostruke uloge u brojnim patološkim stanjima, uključujući modulaciju prirođenog i stečenog imunološkog sustava u perifernim upalnim stanicama (65, 179 - 182). U odgovoru na ishemijsko oštećenje, rezidentne stanice mikroglije proliferiraju i pritom pojačano izražavaju galektin-3 na svojoj površini (drugi naziv za galektin-3 je Mac-2, biljeg aktivirane mikroglije) (65).

Kako bismo potvrdili da je galektin-3 izražen na proliferirajućim stanicama, učinjeno je dvostruko obilježavanje ishemičnog moždanog tkiva protutijelima anti-BrdU i anti-Mac-2. Obilježavanje je otkrilo da oko 80% stanica pozitivnih na BrdU (proliferirajućih stanica) kolokalizira sa Mac-2 pozitivnim stanicama (*Slika 20A*).

Nadalje, kako bismo procijenili postoji li razlika u izražaju galektina-3 između skupina miševa s onemogućenim *Tlr2* genom i miševa divljeg tipa, učinjeno je imunofluorescentno obilježavanje anti-Mac-2 protutijelom 3 dana nakon MCAO s adekvatnom kvantitativnom analizom uočenog signala (*Slike 20B* i *20C*).



Slika 20. Izražaj galektina-3 (Mac2) 3 dana nakon MCAO. A: Dvostruko imunohistokemijsko obilježavanje anti-BrdU (zeleno) i anti-Mac-2 (crveno) protutijelima otkriva gotovo 80% kolokalizaciju (bijeke strelice). B: Reprerzentativne fotografije prikazuju izostanak Mac-2 izražaja u fiziološkim uvjetima o obje skupine miševa. Smanjenu Mac-2 imunoreaktivnost uočena je na rezovima *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa 3 dana nakon MCAO u odnosu na intenzitet obilježavanja uočen u *WT* skupini miševa. C: Kvantitativna analiza Mac-2 imunoreaktivnosti 3 dana nakon MCAO ukazuje na statistički značajno smanjenu ekspresiju Mac-2 u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa 3 dana nakon MCAO. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± SEM (n=4; \*p<0.05). Mjerna oznaka: A: 50 μm, B: 100 μm.

Tablica 16. Kvantitativna analiza intenziteta Mac2 imunofluorescentnog signala. Vrijednosti su izražene u arbitrarnim jedinicama.

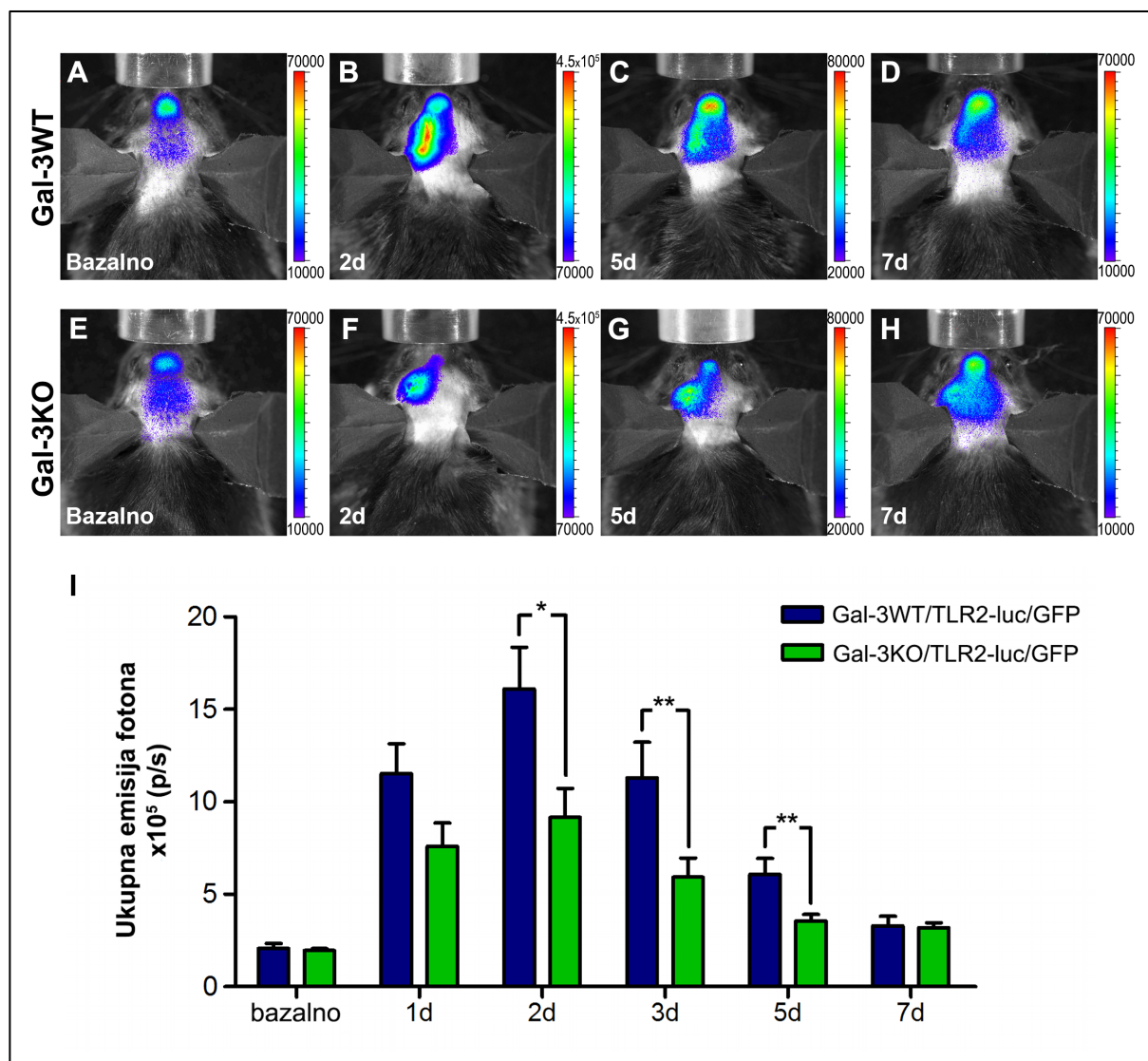
	<i>WT</i>	<i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	p-vrijednost
kontrola	0.06 X 10 <sup>9</sup> ± 0.03 X 10 <sup>9</sup>	0.03 X 10 <sup>9</sup> ± 0.01 X 10 <sup>9</sup>	p=0.448
3 dana	4,17X 10 <sup>9</sup> ± 0,20	2,48X 10 <sup>9</sup> ± 0,75 X 10 <sup>9</sup>	*p=0.019

Izražaj galektina-3 (Mac-2) u fiziološkim uvjetima je vrlo nizak, ispod razine detekcije. Međutim, 3 dana nakon nastanka ishemijske lezije dolazi do znatne indukcije galektina-3 (Slika 20B). Rezultati kvantitativne analize intenziteta Mac-2 signala ukazala je na 40,52% smanjenje signala u skupini miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom u odnosu na miševe divljeg tipa 3 dana nakon MCAO (Slika 20 i Tablica 16).

Navedeni rezultati upućuju kako TLR2 ima važnu ulogu u postishemijskoj aktivaciji i proliferaciji rezidentnih mikrogljalnih stanica.

#### 4.5. Galektin-3 je potreban za adekvatnu indukciju TLR2 i aktivaciju mikrogljalnih stanica

U iznad navedenim rezultatima prikazana je smanjena ekspresija galektina-3 u skupini miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom. Kako bismo bolje definirali međuodnos galektina-3 i TLR2, korištene su transgenične mišje linije koje sadržavaju *Tlr2/luc/gfp* dvostruki-bicistronski reporterski sustav u kojem je izražaj reporterskih molekula luciferaze i GFP-a pod kontrolom *Tlr2* promotora. U navedenom mišjem modelu, korištenjem metode oslikavanja bioluminiscencije CCD kamerom visoke osjetljivosti i rezolucije, možemo vizualizirati mikrogljalnu aktivaciju/TLR2 odgovor u više vremenskih točaka kroz duži vremenski period u živom mišu. Navedena transgenična mišja linija sparena je sa *Gal-3*<sup>-/-</sup> miševima; na taj način stvorene su dvije skupine miševa: *Tlr2/luc/gfp Gal-3*<sup>-/-</sup> i *Tlr2/luc/gfp Gal3*<sup>+/+</sup>. Oslikavanje bioluminiscencije provedeno je u vremenskim točkama od 1, 2, 3, 5 i 7 dana nakon MCAO (Slika 21). 1 dan prije operativnog zahvata okluzije srednje moždane arterije izmjerena je bazalna vrijednost aktivnosti luciferaze u obje skupine miševa.



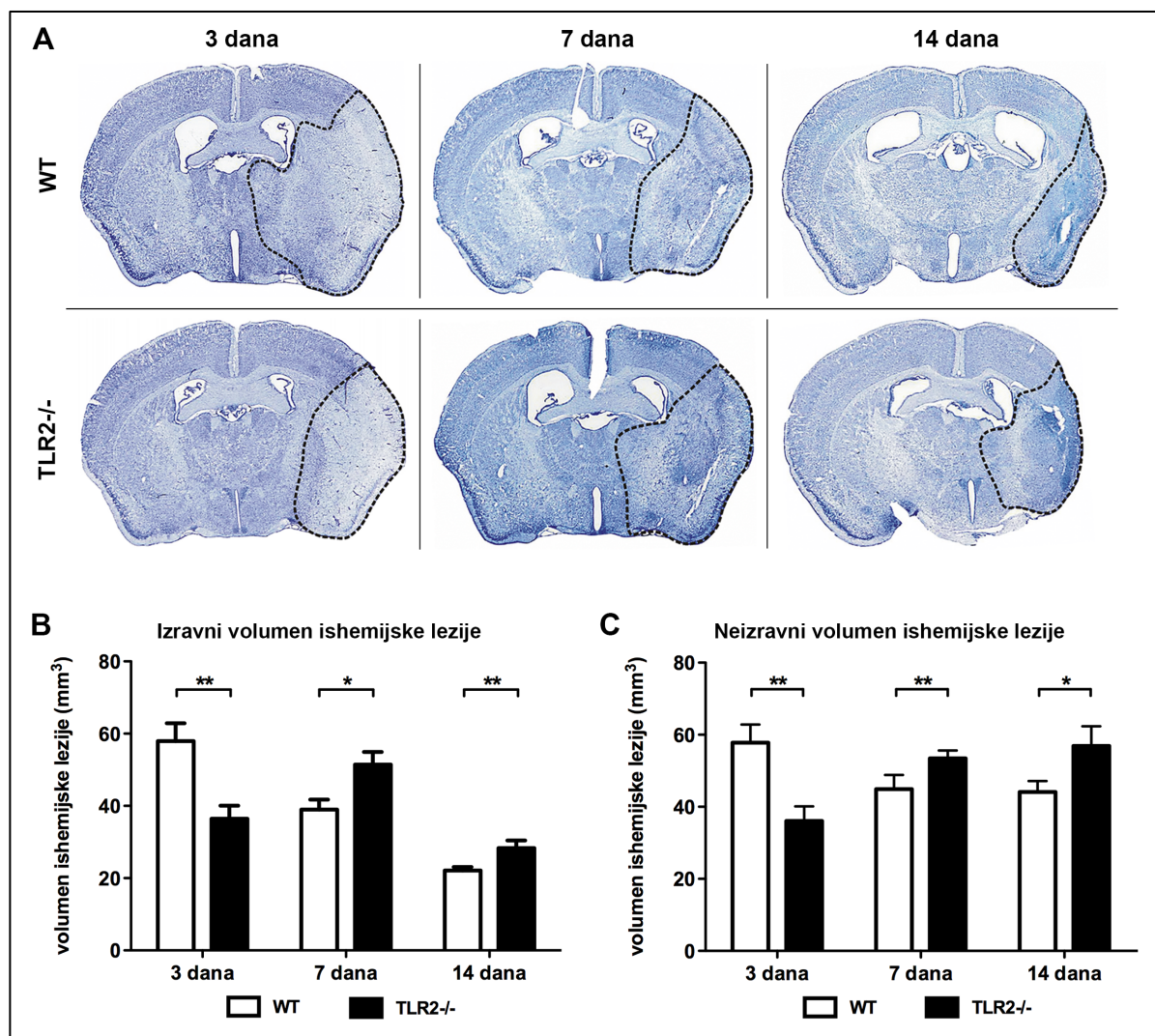
*Slika 21.* Slikovni prikaz biofotonskog/bioluminiscentnog TLR2 signala u stvarnom vremenu, izmjenjen na *Gal-3*<sup>-/-</sup> i *Gal-3WT Tlr2/luc/gfp* mišjim linijama. A-D: Reprezentativni prikazi izmjenjenog intenziteta bioluminiscentnog signala u *Gal-3WT* i *Gal-3*<sup>-/-</sup> miševa (E-H) prije, te 1, 2, 3, 5 i 7 dana nakon MCAO. Prikazano oslikavanje bioluminiscencije provedeno je na jednoj životinji u više vremenskih točki, te predstavlja vremenski i prostorni izražaj TLR2 odgovora/mikroglijalne aktivacije kroz period od 7 dana nakon MCAO. Spektar boja prikazan sa desne strane slika predstavlja intenzitet broja fotona zabilježenog na određenom području (crvena i žuta predstavljaju najvišu vrijednost). I: Kvantifikacija bioluminiscentnog signala dobivenog reporterskim sustavom – luciferazom, dobivena programom *LivingImage* 4.1 (CaliperLS) prikazuje značajno višu indukciju TLR2 signala prisutnu u mozgu *Gal-3WT* miševa u odnosu na miševe sa onemogućenim *Gal-3* genom. (n=8-10, \*p=0,02, \*\*p=0,007).

Na *Slici 21*, prikazana je analiza TLR2 odgovora nakon MCAO, koja je ukazala na smanjeni intenzitet TLR2 signala u skupini miševa sa onemogućenim *Gal-3* genom, u usporedbi sa skupinom miševa sa funkcionalnim *Gal-3* genom. Statistički značajna razlika uočena je 2 dana nakon MCAO, a trajala je do petog dana nakon nastanka ishemijske ozljede. 7 dana nakon MCAO nije uočena razlika u izražaju TLR2 između dvije skupine miševa.

Navedeni rezultati ukazuju kako očito postoji povezanost između TLR2 i galektin-3 signalnog puta. Uz navedeno, rezultati nam ukazuju kako je prisutnost galektina-3 potrebna za adekvatnu postishemijsku aktivaciju stanica mikroglije i indukciju TLR2 odgovora.

#### **4.6. Odgođeno odumiranje neurona i egzacerbacija ishemijske ozljede u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom**

Aktivirane/proliferirajuće stanice mikroglije, pozitivne na galektin-3 djeluju neuroprotektivno na način da izlučuju inzulinu sličan faktor rasta 1 – IGF-1 (engl. *Insuline-like Growth Factor-1 – IGF-1*) (65). Međutim, do sada nije jasno kako poremećena aktivacija i proliferacija mikroglijalnih stanica utječu na razvoj ishemijske lezije u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom. Istraživanja koja su do sada provedena na miševima sa onemogućenim *Tlr2* genom ili sa inhibirajućim protutijelima protiv receptora TLR2 otkrila su smanjenu veličinu ishemijske lezije u prvih 24 - 72 sata u odnosu na veličinu ishemijske lezije kod miševa divljeg tipa (141, 152, 153, 172). Budući da je TLR2 izražen i u kasnijoj fazi odgovoran na ishemijsku leziju, provedena je analiza veličine lezije 3, 7 i 14 dana nakon MCAO. Kvantifikacija je bila provedena na rezovima mozгова obojenim prema Nisslu, u skupinama miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom, te kod miševa divljeg tipa (*Slika 22*) (broj životinja = 10/skupini/vremenskoj točki).



Slika 22. Procjena veličine ishemijske lezije 3, 7 i 14 dana nakon MCAO u *Tlr2*<sup>-/-</sup> i *WT* miševa. A: Reprezentativne fotografije rezova mozga bojenih prema Nisslu sa označenom ishemijskom lezijom (isprekidana crna linija). B: Izračun "izravnog volumena ishemijske lezije" u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa ukazuje na manju leziju u odnosu na *WT* skupinu 3 dana nakon MCAO, dok je 7 i 14 dana nakon MCAO volumen lezije veći od volumena *WT* miševa. C: Manji "neizravni volumen ishemijske lezije" u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa u odnosu na *WT* skupinu 3 dana nakon MCAO. 7 i 14 dana nakon MCAO neizravni volumen ishemijske lezije veći je u skupini *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa u odnosu na skupinu *WT* miševa. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± SEM (n=10, \*p<0.05, \*\*p<0.001).



Tablica 17. Prikaz vrijednosti volumena izravne i neizravne ishemijske lezije u *WT* i *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa (izraženo u mm<sup>3</sup>).

	<i>WT</i>	<i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	p-vrijednost
<b>"Izravni" volumen ishemijske lezije</b>			
3 dana	57.92 ± 4.98	36.47 ± 3.58	**p=0.003
7 dana	39.00 ± 2.78	51.43 ± 3.47	*p=0.012
14 dana	22.15 ± 0.96	28.35 ± 2.09	**p=0.010
<b>"Nezravni" volumen ishemijske lezije</b>			
3 dana	57.82 ± 5.04	36.09 ± 4.04	**p=0.004
7 dana	42.29 ± 3.24	53.46 ± 2.19	**p=0.010
14 dana	44.10 ± 3.08	56.92 ± 5.43	*p=0.049

Kao što je očekivano, miševi sa onemogućenim *Tlr2* genom imali su statistički značajno smanjenu veličinu "izravne" ishemijske lezije i to za 37,03% u odnosu na miševе divljeg tipa 3 dana nakon MCAO (*Slike 22A, 22B*), što je u skladu s rezultatima većine prethodno provedenih istraživanja (141, 152).

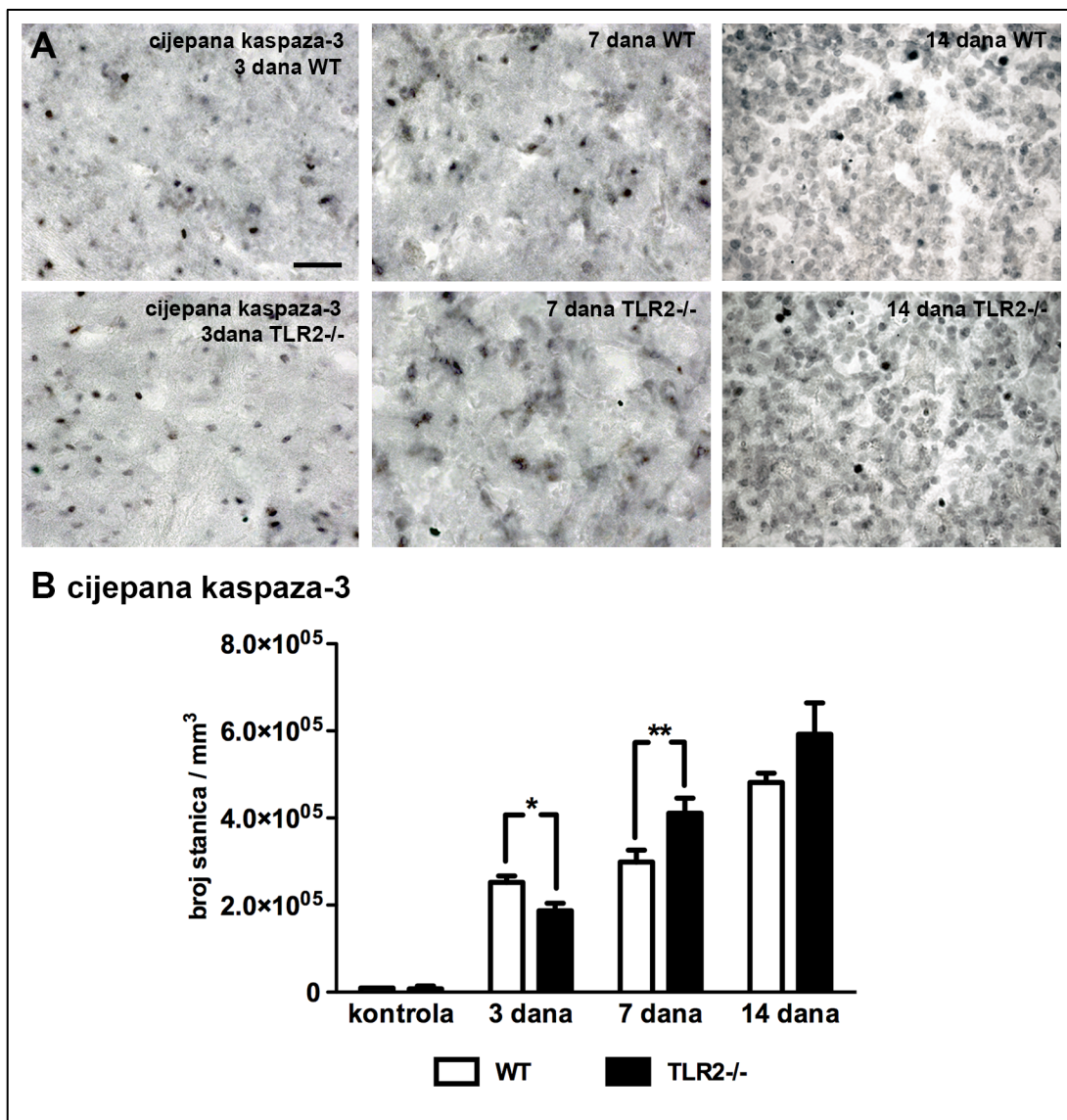
Iznenadujuće, 7 dana nakon MCAO izravni volumen ishemijske lezije kod miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom bio je 31,87% veći od izravnog volumena u skupini miševa divljeg tipa. Zbog postishemijske konsolidacije ishemičnog tkiva i stvaranja glijalnog ožiljka, u kasnijoj vremenskoj točki - 14 dana nakon MCAO, "izravni volumen ishemijske lezije" bio je smanjen u obje skupine miševa u odnosu na vremensku točku 3 i 7 dana nakon MCAO. Unatoč tome, izravni volumen ishemijske lezije ostao je statistički značajno veći za 27,99% u skupini miševa sa nemogućenim *Tlr2* genom u usporedbi sa skupinom miševa divljeg tipa (*Slike 22A i 22B, Tablica 17*).

Kvantitativna procjena veličine "neizravnog volumena ishemijske lezije" (volumen zdravog tkiva koje odgovara volumenu oštećenog, ishemičnog tkiva, bez obzira na procese postishemijske konsolidacije i formiranja glijalnog ožiljka) 3 dana nakon MCAO pokazala je značajno smanjen volumen, za 37,58%, u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom u odnosu na

skupinu miševa divljeg tipa (*Slike 22A i 22C*). K tome, 7 dana nakon MCAO, neizravni volumen ishemijske lezije bio je 26,41% veći kod miševa s onemogućenim *Tlr2* genom u odnosu na miševe divljeg tipa, dok je u kasnijoj vremenskoj točki, 14 dana nakon MCAO, razvoj ishemijske lezije stagnirao, a volumen neizravne ishemijske lezije ostao veći kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa u odnosu na *WT* skupinu (*Slike 22A i 22C, Tablica 17*).

Iz navedenih rezultata možemo zaključiti kako se u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom ishemijska ozljeda povećava u kasnijim vremenskim točkama nakon MCAO, iako je u ranijoj fazi odgovora na ishemijsku leziju volumen lezije manji u odnosu na skupinu miševa divljeg tipa.

Nadalje, u istraživanju je proučavano je li naknadno povećanje ishemijske lezije udruženo s istovremenim povećanjem odumiranja neurona. Broj apoptotičnih stanica u obje skupine određen je imunohistokemijskim obilježavanjem stanica anti-cijepana kaspaza-3 protutijelom, 3, 7 i 14 dana nakon MCAO (*Slika 23*).



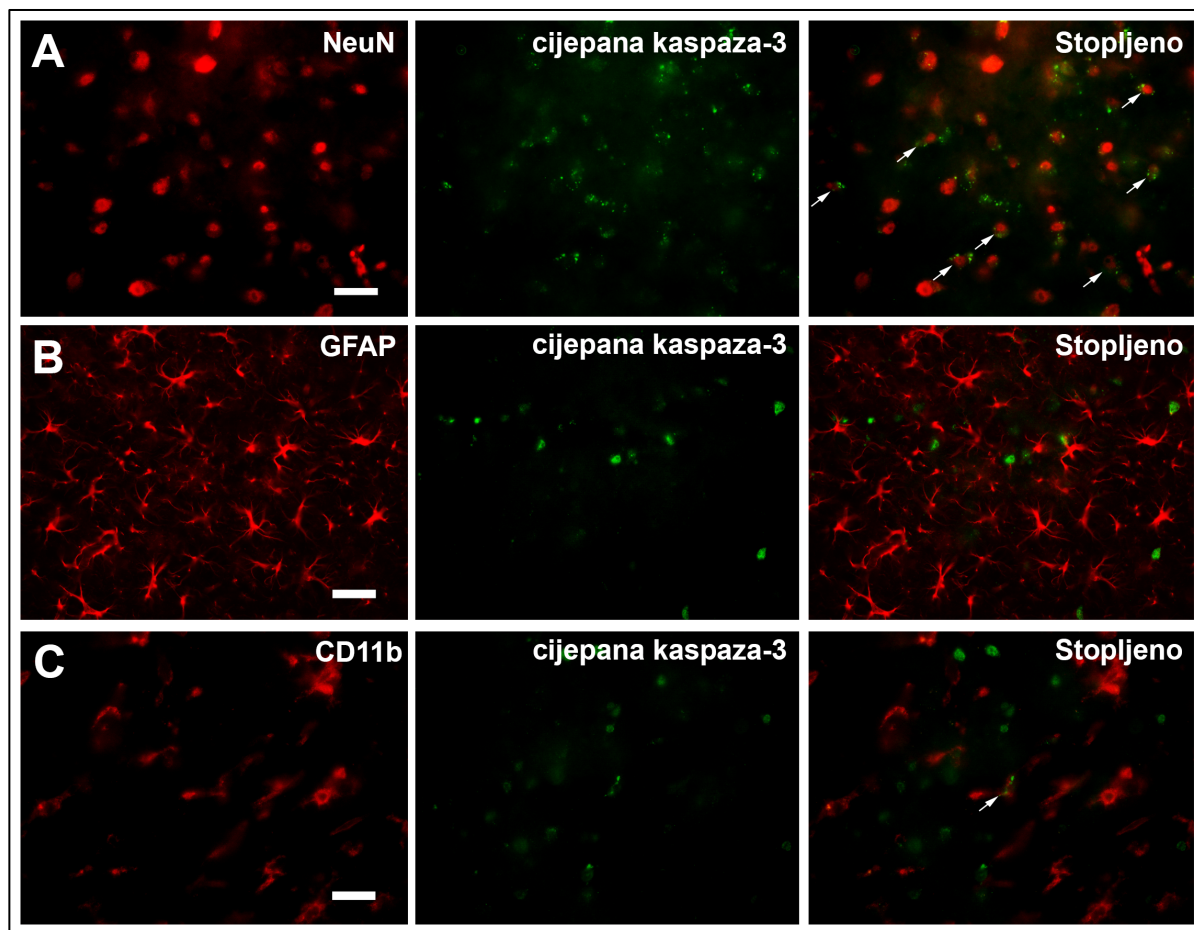
Slika 23. Odgođeno apoptotsko odumiranje stanica u miševa s onemogućenim *Tlr2* genom nakon MCAO. A: Reprezentativni prikazi anti-cijepana kaspaza-3 imunoreaktivnosti u *Tlr2*<sup>-/-</sup> i *WT* miševa 3, 7 i 14 dana nakon MCAO. B: Kvantifikacija pozitivno označenih stanica prikazuje povećani broj apoptotičnih stanica u *WT* miševa 3 dana nakon MCAO, dok je u 7 dana nakon nastanka lezije broj apoptotičnih stanica bio veći u skupini *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa. 14 dana nakon MCAO broj pozitivnih stanica bio je veći u *Tlr2*<sup>-/-</sup> skupini, ali ne statistički značajno. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± SEM (n=4, \*p<0.05, \*\*p<0.001). Mjerna oznaka: 25 μm.

Tablica 18. Prikaz broja stanica pozitivno obilježenih protutijelom anti-cijepana kaspaza-3 na mjestu ishemijske lezije.

	<i>WT</i>	<i>TLR2</i> <sup>-/-</sup>	p-vrijednost
3 dana	2.52 X 10 <sup>5</sup> ± 0.15 X 10 <sup>5</sup>	1.87 X 10 <sup>5</sup> ± 0.18 X 10 <sup>5</sup>	*p=0.046
7 dana	2.99 X 10 <sup>5</sup> ± 0.27 X 10 <sup>5</sup>	4.11 X 10 <sup>5</sup> ± 0.35 X 10 <sup>5</sup>	*p=0.046
14 dana	4.81 X 10 <sup>5</sup> ± 0.21 X 10 <sup>5</sup>	5.92 X 10 <sup>5</sup> ± 0.72 X 10 <sup>5</sup>	p=0.213

Kao što je vidljivo na *Slici 23 i Tablici 18*, broj apoptotičnih stanica 3 dana nakon MCAO pokazao je 1,35 puta manji broj stanica u skupini miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom u usporedbi sa brojem stanica kod miševa divljeg tipa, sugerirajući kako nedostatak *Tlr2* gena u ranoj fazi odgovora nakon MCAO ima neuroprotektivni učinak. U kasnijoj vremenskoj točki, 7 dana nakon MCAO, broj apoptotičnih stanica po mm<sup>3</sup> bio je 1,37 puta veći u skupini miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom u odnosu na skupinu miševa divljeg tipa što je u skladu sa rezultatima procjene volumena ishemijske lezije. 14 dana nakon MCAO broj apoptotičnih stanica ostao je veći u skupini *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa u odnosu na *WT* skupinu, iako ne statistički značajno, budući da je varijabilnost broja stanica unutar skupina bila velika.

Kako bismo odredili u kojoj je populaciji stanica obilježavanje anti-cijepana kaspaza-3 protutijelom bilo prisutno, korištena je metoda dvostrukog imunofluorescentog obilježavanja kombiniranjem anti-cijepana kaspaza-3 sa anti-NeuN (populacija neurona), anti-GFAP (populacija astrocita) i anti-CD11b (populacija mikroglije/makrofaga) protutijelima, 3 dana nakon MCAO (*Slika 24*).

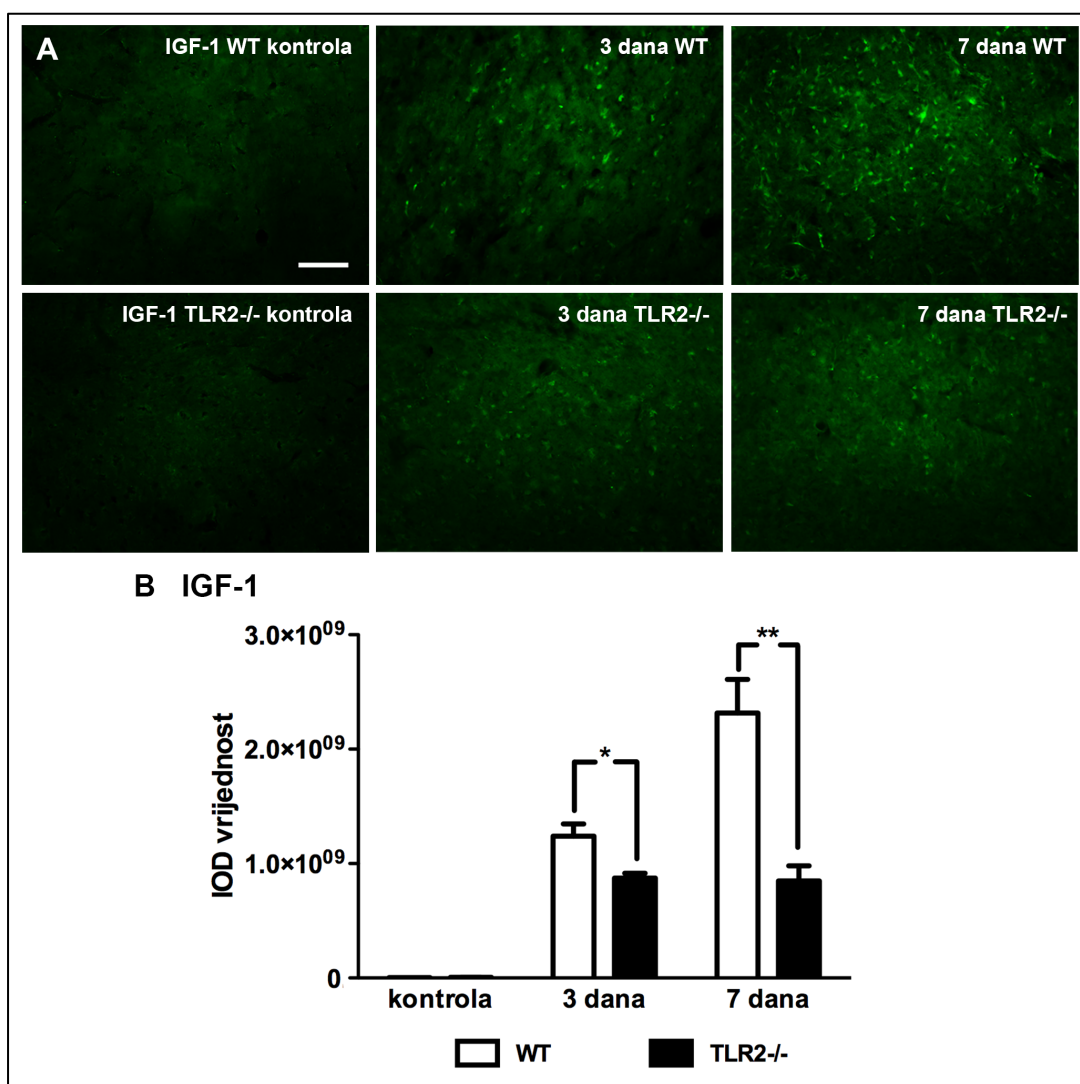


*Slika 24.* Određivanje populacije stanica pozitivno označene anti-cijepana kaspaza-3 protutijelom 3 dana nakon MCAO metodom imunofluorescencije sa dva protutijela. A: Dvostruko obilježavanje anti-cijepana kaspaza-3 (zeleno) i anti-NeuN protutijelom (crveno), uz prikazanu kolokalizaciju u većini stanica (bijele strelice). B: Nije uočena kolokalizacija između stanica koje izražavaju cijepanu kaspazu-3 (zeleno) i biljeg astrocita (GFAP, crveno). C: Nekoliko stanica mikroglije/makrofaga (anti-CD11b protutijelo) pozitivno je na cijepanu kaspazu-3 (zeleno, kolokalizacija označena bijelim strelicama). Mjerna oznaka: 25  $\mu$ m.

U više od 90% anti-cijepana kaspaza-3 pozitivnih stanica uočena je kolokalizacija sa anti-NeuN protutijelom, biljegom neurona (*Slika 24A*). Kao što je vidljivo na *Slici 24C*, mali broj anti-cijepana kaspaza-3 pozitivnih stanica bio je pozitivno obilježen biljegom mikroglije/makrofaga - anti-CD11b protutijelom, dok kolokalizacija anti-cijepana kaspaza-3 pozitivnih stanica i astrocita (GFAP pozitivnih stanica) nije uočena (*Slika 24B*). U skladu s navedenim rezultatima, možemo zaključiti kako je egzacerbacija kasne ishemijske ozljede udružena sa pojačanom odgođenom apoptozom živčanih stanica.

#### 4.7. Snižena razina IGF-1 u mozgu miševa s onemogućenim *Tlr2* genom nakon ishemijske ozljede

Prethodna istraživanja pokazala su kako aktivirane i proliferirajuće stanice mikroglije proizvode i oslobađaju neurotrofne i antiapoptotske faktore kao što je IGF-1, te stoga djeluju neuroprotektivno (65, 183, 184). Budući da je kod miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom uočen smanjeni proliferacijski kapacitet, te posljedično smanjeni broj mikroglijalnih stanica, za pretpostaviti je kako je i razina IGF-1 smanjena, što bi moglo djelomice pojasniti odgođeno apoptotsko odumiranje neurona uočeno u kasnijoj fazi nakon MCAO. Razina IGF-1 izmjerena je pomoću mjerenja imunofluorescentnog signala dobivenog označavanjem anti-IGF-1 protutijelom 3 i 7 dana nakon MCAO u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom i kod miševa divljeg tipa (Slika 25).



*Slika 25:* Snižena razina IGF-1 u mozgu *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa nakon MCAO. A: Prikazi anti-IGF-1 imunoreaktivnosti u kontrolnoj, *Tlr2*<sup>-/-</sup> i *WT* skupini miševa 3, i 7 dana nakon MCAO. B: Statistički značajno snižen intenzitet IGF-1 signala u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa u odnosu na *WT* miševe u obje vremenske točke nakon MCAO. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± SEM (n=4, \*p<0.05, \*\*p<0.001). Mjerna oznaka: 100 μm.

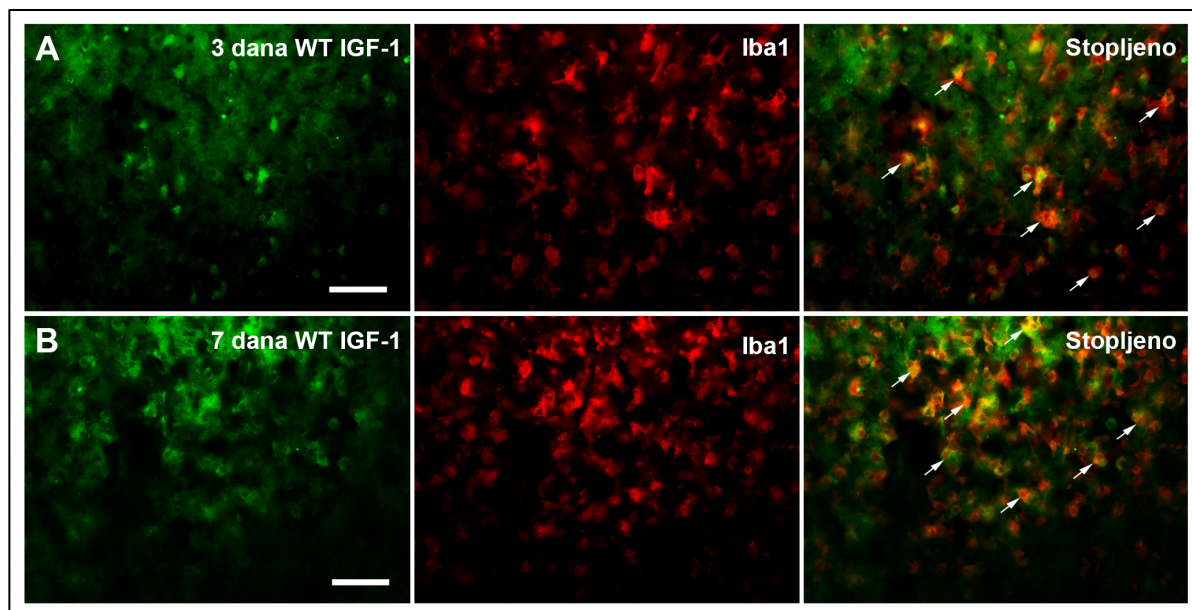
*Tablica 19.* Kvantitativna analiza intenziteta IGF-1 imunofluorescentnog signala. Vrijednosti su izražene u arbitrarnim jedinicama.

	<i>WT</i>	<i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	p-vrijednost
kontrola	0.004 X 10 <sup>9</sup> ± 0.01 X 10 <sup>9</sup>	0.006 X 10 <sup>9</sup> ± 0.01 X 10 <sup>9</sup>	p=0.283
3 dana	1.24 X 10 <sup>9</sup> ± 0.11 X 10 <sup>9</sup>	0.87 X 10 <sup>9</sup> ± 0.04 X 10 <sup>9</sup>	*p=0.039
7 dana	2.32 X 10 <sup>9</sup> ± 0.29 X 10 <sup>9</sup>	0.85 X 10 <sup>9</sup> ± 0.13 X 10 <sup>9</sup>	**p=0.004

Kao što je bilo očekivano, 3 dana nakon MCAO u obje skupine došlo je do značajnog pojačanja intenziteta signala u odnosu na zdravu kontralateralnu stranu. Međutim, kvantitativna analiza intenziteta IGF-1 signala pokazala je značajnu 1,42 puta manju vrijednost u skupini miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom u odnosu na miševe divljeg tipa 3 dana nakon MCAO, te 2,73 puta manju vrijednost intenziteta signala 7 dana nakon MCAO (*Slika 25* i *Tablica 19*).

Određivanje populacije stanica koja pojačano izražava IGF-1 u odgovoru na ishemijsku leziju provedeno je metodom dvostrukog obilježavanja fluorescentnim protutijelima, kombinirajući anti-IGF-1 protutijelo sa protutijelima specifičnima za određene populacije stanica: Map2 (neuroni), GFAP (astrociti), Iba1 (mikroglia/ makrofazi) u vremenskim točkama 3 i 7 dana nakon MCAO.





*Slika 26.* Stanice mikroglije/makrofaga izražavaju IGF-1 prilikom odgovora na ishemijsku leziju. A i B: Dvostruko obilježavanje rezova mozga sa anti-IGF-1 (zeleno) i anti-Iba1 (crveno) protutijelom, uz naznačenu kolokalizaciju (bijeले strelice), 3 dana (A) i 7 dana (B) nakon MCAO. Mjerna oznaka: 50  $\mu$ m.

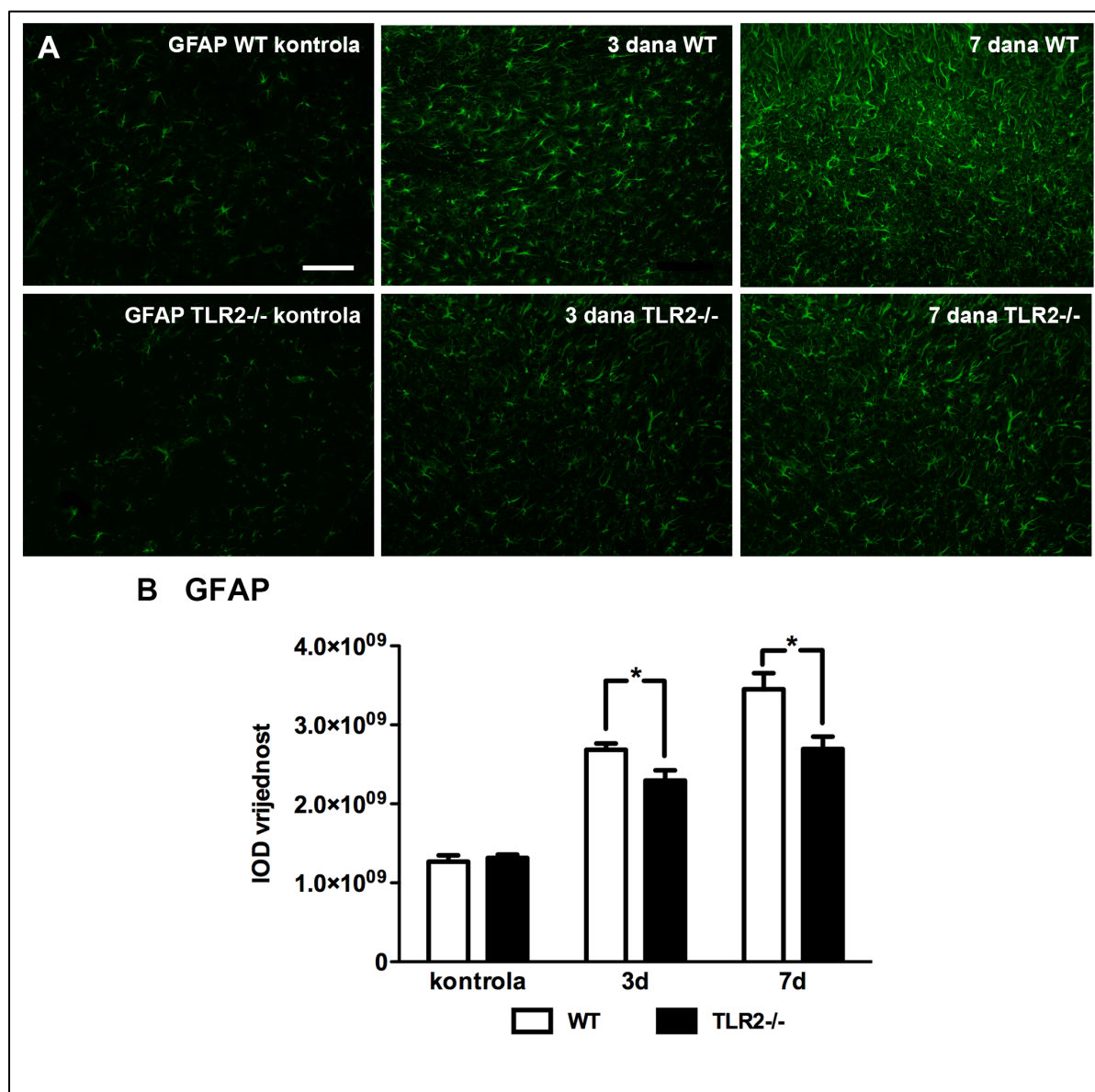
Kao što je prikazano na *Slici 26*, izražaj IGF-1 na području ishemijske lezije pripadao je gotovo isključivo populaciji stanica mikroglije/makrofaga, što odgovara rezultatima prethodnih istraživanja (184). Nije uočen izražaj IGF-1 na populaciji astrocita - GFAP pozitivnih stanica, niti na populaciji neurona - Map2 pozitivnih stanica.

Navedeni rezultati ukazuju kako je poremećeni imunološki odgovor u miševa s onemogućenim *Tlr2* receptorom uzrokovao smanjenu proizvodnju IGF-1 (vrlo potentne antiapoptotske molekule za neurone koji se nalaze u uvjetima stresa) unutar i oko mjesta nastale ishemijske lezije. Snižena razina IGF-1 je jedan od mogućih razloga koji je uzrokovao pojačano apoptotsko odumiranje neurona i povećanje volumena ishemijske lezije u kasnijim fazama odgovora uočeni u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom.



#### 4.8. Poremećeno nakupljanje astrocita na mjestu ishemijske lezije u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa

U odgovoru mozga na ishemijsko oštećenje javlja se aktivacija astrocita, te započinje stvaranje glijalnog ožiljka na mjestu ishemijskoga oštećenja. Ukoliko je reaktivna astroglioza narušena, u uvjetima ishemije javlja se povećani volumen ishemijske lezije (185). Budući da je našem istraživanju uočen povećani izravni volumen ishemijske lezije, u skupini miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom postoji mogućnost neadekvatnog stvaranja glijalnog ožiljka na mjestu ishemijske lezije. Kako bismo dobili uvid u aktivaciju astrocita prisutnih oko mjesta nastale ishemijske ozljede, učinjeno je imunofluorescentno obilježavanje pomoću anti-GFAP protutijela na skupinama miševa sa onemogućenim TLR2 genom, te u skupini miševa divljeg tipa 3 i 7 dana nakon postupka MCAO (Slika 27).



*Slika 27.* Smanjeni izražaj GFAP ukazuje na smanjenu astroglijalnu reaktivnost prisutnu u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom. A: Reprezentativne fotografije GFAP imunoreaktivnosti u kontrolnoj skupini, te 3 i 7 dana nakon MCAO. U odnosu na kontrolnu skupinu uočeno je zamjetno pojačanje izražaja GFAP u obje skupine miševa. Uz povećani broj astrocita prisutan nakon nastanka ishemijskog oštećenja, prisutna je pojava zadebljanja staničnih izdanaka astrocita sa jačim izražajem GFAP, što odgovara reaktivnoj astrogliozi. U skupini *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa uočava se smanjen izražaj GFAP u obje vremenske točke nakon MCAO. (B) Kvantitativna analiza mjerenjem integrirane optičke gustoće pokazuje statistički značajno smanjen intenzitet signala u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa u usporedbi sa signalom izmjerenim u skupini *WT* miševa. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± SEM (n=4, \*p<0.05). Mjerna oznaka: 100 μm.

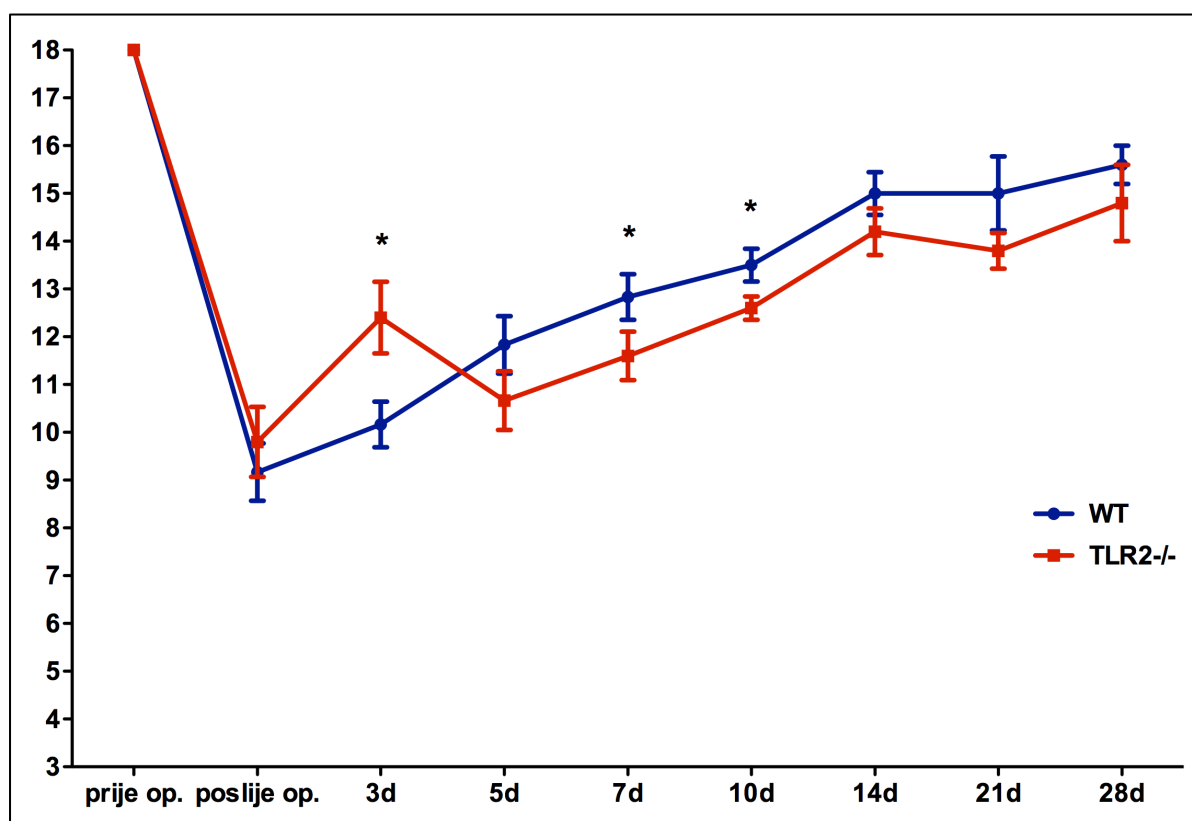
*Tablica 20.* Vrijednosti intenziteta GFAP imunofluorescentnog signala. (vrijednosti su izražene u arbitratnim jedinicama)

	<i>WT</i>	<i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup>	p-vrijednost
kontrola	1,27 X 10 <sup>9</sup> ± 0,08 X 10 <sup>9</sup>	1,31 X 10 <sup>9</sup> ± 0,04 X 10 <sup>9</sup>	p=0,638
3 dana	2,69 X 10 <sup>9</sup> ± 0,08 X 10 <sup>9</sup>	2,29 X 10 <sup>9</sup> ± 0,13 X 10 <sup>9</sup>	*p=0,043
7 dana	3,45 X 10 <sup>9</sup> ± 0,20 X 10 <sup>9</sup>	2,69 X 10 <sup>9</sup> ± 0,15 X 10 <sup>9</sup>	*p=0,026

Na *Slici 27* prikazana je imunofluorescentna analiza GFAP signala izmjerenog u skupinama *Tlr2*<sup>-/-</sup> i *WT* miševa. U obje skupine vidljiva je pojava reaktivne astroglioze, što je zaključeno na temelju morfoloških pokazatelja zadebljanja staničnih izdanaka astrocita sa pojačanim izražajem GFAP. Zanimljivo, u skupini miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom uočena je smanjena razina izražaja GFAP što nam govori kako je aktivacija astrocita i akumulacija na mjestu ishemijskog oštećenja poremećena u miševa kojima nedostaje funkcionalni *Tlr2* gen (*Slike 27A i 27B, Tablica 20*). Uočeno smanjenje reaktivnosti astrocita vjerojatno dijelom doprinosi učenom povećanju izravnog volumena ishemijske lezije prisutnog u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa, kao i povećanom broju apoptotičnih stanica prisutnih na mjestu lezije.

#### 4.9. Neurološki status miševa s onemogućenim *Tlr2* genom nakon MCAO

Kako bi se procijenio opseg neurološkog ispada nastalog kao posljedica ishemijskog oštećenja mozga, koriste se standardizirani testovi za procjenu neurološkog oštećenja. Najčešće korišteni test publiciran je od autora Garcia i sur., 1995 (175), a korišten je u mnogim radovima, primjerice (154, 186). Ljestvica vrijednosti dobivenih navedenim testom kreće se od 3 do 18, gdje ocjena 18 označava zdravu životinju urednog neurološkog statusa. Neurološka procjena vršena je jedan dan prije, neposredno nakon operacije, te 3, 5, 7, 14, 21 i 28 dana nakon MCAO. Kako bismo odredili odgovara li neurološki ispad uočenim promjenama veličine ishemijske lezije, procjena je provedena na skupinama miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom kao i na skupini miševa divljeg tipa (Slika 28).

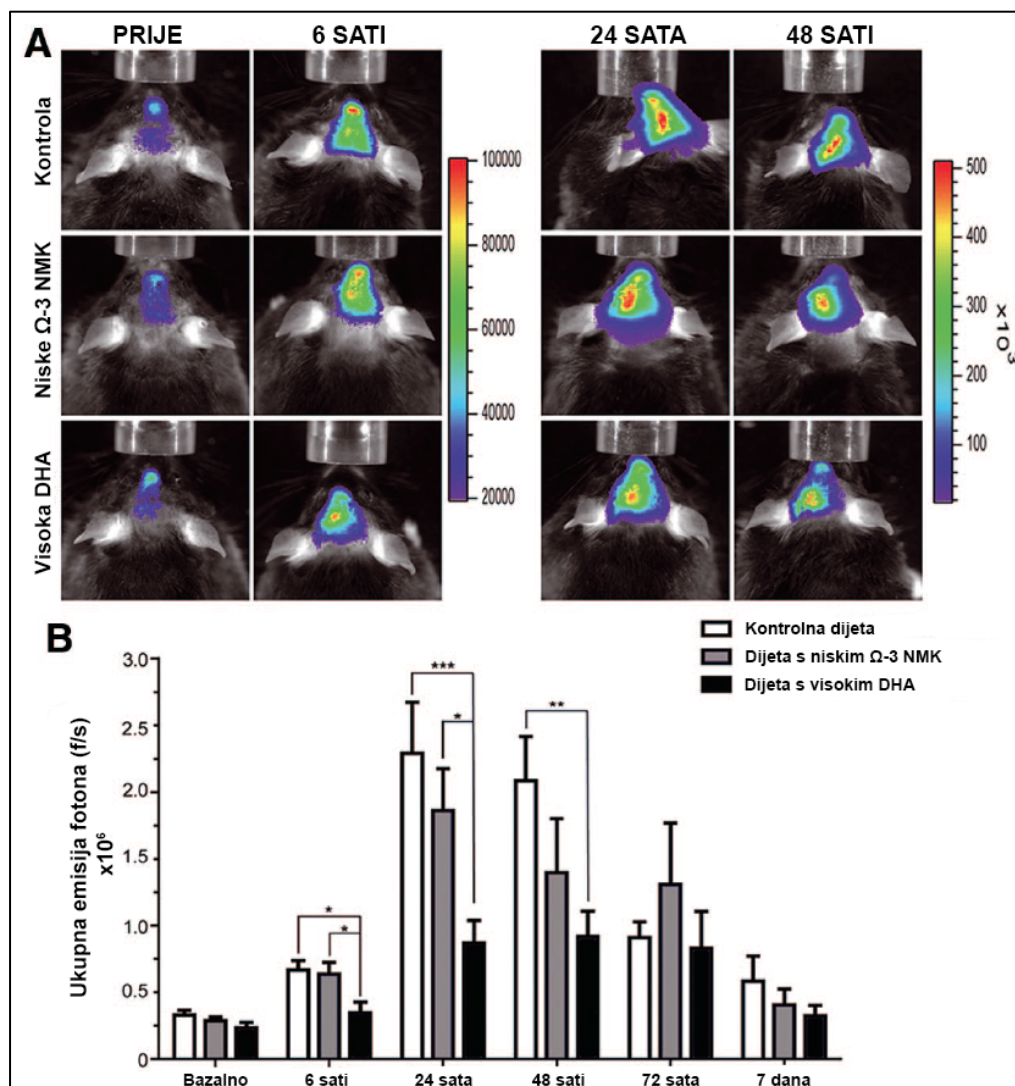


Slika 28. Neurološka procjena miševa tijekom perioda od četiri tjedna nakon ishemijskog oštećenja mozga. *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševi pokazuju manji neurološki ispad u ranoj fazi oporavka nakon ishemijske lezije, dok je u kasnijoj fazi (7 dana i dalje) neurološki ispad veći u odnosu na skupinu *WT* miševa (n=6/skupini, \*p<0,05).

Prikazani rezultati, ukazuju na privremeno manji neurološki ispad prisutan u skupini miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom u odnosu na miševe divljeg tipa. Međutim, između vremenske točke 3 i 7 dana dolazi do obrata u odnosu rezultata procjene neurološkog oštećenja, tako da od sedmog dana na dalje *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševi imaju veći neurološki ispad u odnosu na *WT* miševe. U kasnijim vremenskim točkama, 14 dana i dalje, razlika nije statistički značajna. Budući da je u tim vremenskim točkama vrijednost rezultata iznosila 14 i više (na ljestvici 0 do 18), za pretpostaviti je da test nije dovoljno osjetljiv kako bi mogao prepoznati eventualne suptilne razlike u ovim vremenskim točkama. Unatoč tome, jasno je vidljiva tendencija većeg neurološkog ispada u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa u odnosu na *WT* skupinu. Navedeni rezultati u skladu su s rezultatima procjene volumena ishemijske lezije i apoptotskog odumiranja neurona prikazanih u prethodno navedenim odjeljcima.

#### 4.10. Modulacija funkcionalnog TLR2 odgovora pomoću dijeta bogate omega-3 nezasićenim masnim kiselinama

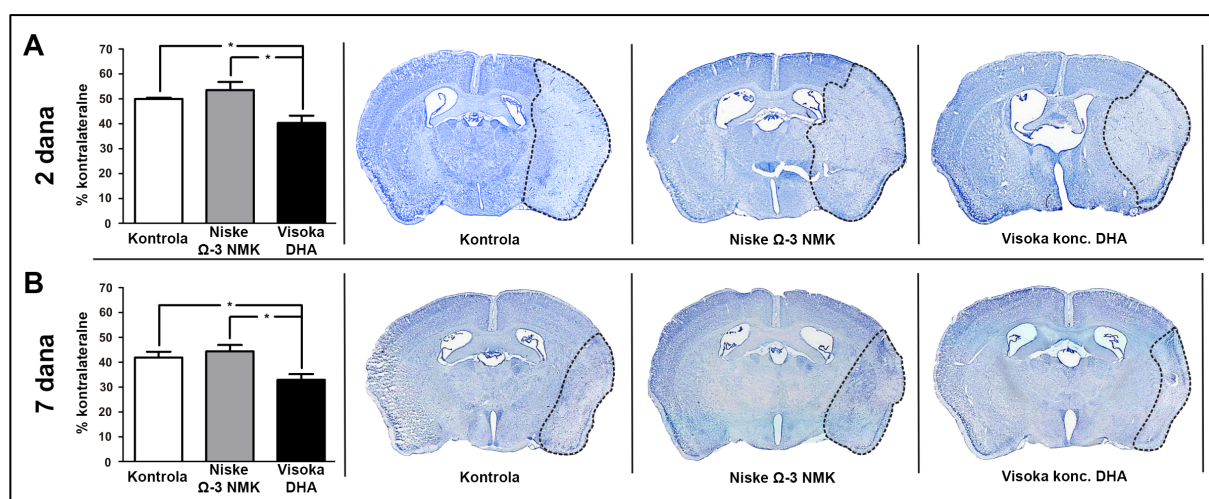
Kako bi se utvrdio utjecaj prehrane bogate DHA na opseg upalnog odgovora posredovanog TLR2 receptorima, i posljedično, na veličinu ishemijske lezije, miševi su podvrgnuti različitim dijetnim režimima. U skupini miševa koji su konzumirali hranu obogaćenu DHA, uočena je smanjena aktivacija TLR2 (Slika 29).



Slika 29. Oslikavanje TLR2 odgovora mjerenjem bioluminiscencije *in vivo* prikazuje protuupalni učinak DHA u odgovoru mozga nakon izazivanja ishemijske lezije. A. Reprezentativni prikazi izmjerene bioluminiscencije u istoj životinji prikazuju dinamiku aktivacije mikroglije/TLR2 odgovora 6, 24, 48 sati nakon MCAO. Raspon boja s desne strane

slika označava broj izmjerenih fotona, crvena boja označava najveći broj. B. Grafički prikaz kvantifikacije bioluminiscentnog signala u periodu od 7 dana nakon MCAO. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM.  $n=9$ , \*\*\* $P<0,01$ ; \* $P<0,05$ .

Prikazani smanjeni upalni odgovor, udružen je sa značajnim smanjenjem veličine ishemijske lezije koja je bila uočena u ranoj fazi (2 dana), kao i u kasnijoj fazi (7 dana) oporavka nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede mozga (Slika 30).



Slika 30. Primjena dijetе obogaćene DHA rezultirala je smanjenom veličinom ishemijske lezije. Analiza rezova bojenih po Nisslu otkrila je značajno manju ishemijsku leziju u skupini miševa koji su bili izloženi povišenoj koncentraciji DHA u hrani u usporedbi sa kontrolnom skupinom, te skupinom koja je bila izložena dijeti sa vrlo malo omega-3 nezasićenih masnih kiselina. Zaštitni učinak uočen je i u kasnijoj fazi odgovora na ishemijsku leziju (7 dana). NMK – nezasićene masne kiseline. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM, \* $P<0,05$ .

## **5. RASPRAVA**

### **5.1. Receptori TLR2 sudjeluju u odgovoru mozga na ishemijsko oštećenje, a uloga receptora TLR2 u razvoju ishemijske lezije ovisna je o vremenu.**

Jedan od osnovnih ciljeva ovog rada bio je razjasniti ulogu receptora TLR2 kao sastavnog dijela prirodnog upalnog odgovora u događajima koji slijede nakon nastanka ishemijske ozljede mozga, te ustanoviti kakva je uloga TLR2 receptora obzirom na krajnji ishod; tj. imaju li izražen zaštitni ili štetni učinak. Dosadašnja istraživanja proučavala su isključivo ulogu receptora TLR2 u ranoj fazi odgovora mozga na ishemijsko oštećenje, tj. proučavane su vremenske točke 1, 2 ili 3 dana nakon nastanka ishemijsko-reperfuzijskoga oštećenja. U tim istraživanjima provedena je usporedba volumena ishemijskoga oštećenja između skupina miševa divljeg tipa i miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom. U većini radova uočeno je značajno smanjenje volumena ishemijske lezije u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa u odnosu na *WT* miševe, što je ukazalo na štetnu ulogu receptora TLR2, ali i općenito upale, u odgovoru mozga na ishemijsku ozljedu (141, 152, 153).

Međutim, unatoč detaljno proučenom složenom slijedu patofizioloških događaja nakon nastanka ishemijske ozljede mozga, za koje je poznato kako se odvijaju u dužem vremenskom periodu nakon nastale ishemijske lezije (opisano u Uvodu), uloga TLR2 receptora je u kasnijim fazama odgovora mozga na ishemijsku ozljedu ostala neistražena. Stoga je postavljena hipoteza ovog rada u kojoj je pretpostavljeno kako receptori TLR2 sudjeluju u odgovoru mozga na ishemijsko oštećenje, i to u ranoj kao i u kasnoj fazi odgovora. Jedan od temeljnih rezultata koji su potaknuli postavljanje hipoteze kako TLR2 receptori sudjeluju i u kasnijim fazama odgovora mozga na ishemijsko oštećenje čine rezultati istraživanja u kojemu je mjerenjem bioluminiscencije *in vivo* (luciferaza pod promotorom *Tlr2* gena) generirana krivulja odgovora TLR2 u odgovoru mozga na ishemijsko oštećenje (162). Navedena krivulja ima bifazični izgled, sa jednim jasno izraženim vrhom 48 sati nakon nastanka ishemije koji se proteže do 7 dana nakon nastanka ozljede; te nešto manjim vrškom u kasnijoj fazi odgovora, točnije, oko 30. dana nakon nastanka ishemijsko-reperfuzijske ozljede. Temeljem izgleda same krivulje aktivacije *Tlr2* receptora, uočava se kako rana aktivacija TLR2 traje duže od do sada proučavana 3 dana nakon nastanka ishemijsko-reperfuzijske ozljede, te se postavlja pitanje imaju li receptori TLR2 izražen

učinak na razvoj ishemijske lezije u kasnijoj fazi odgovora, te ukoliko imaju, radi li se i u ranoj i u kasnoj fazi o jednakom (štetnom) učinku ili pak o različitom utjecaju na razvoj ishemijske lezije.

Stoga, jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je usporediti veličinu ishemijske lezije u *Tlr2*<sup>-/-</sup> i *WT* miševa u ranoj (3 dana), i u kasnoj fazi odgovora mozga na ishemijsku leziju (vremenske točke 7 i 14 dana nakon MCAO). Najprije, važno je naglasiti kako je analizom izračunatih volumena ishemijske lezije uočen različit razvoj ishemijske lezije u sve tri vremenske točke između skupina *Tlr2*<sup>-/-</sup> i *WT* miševa, što nam govori u prilog postavljenoj hipotezi kako TLR2 receptori sudjeluju u odgovoru mozga na ishemijsku leziju. Usporedbom volumena ishemijskoga oštećenja u ranoj fazi odgovora mozga na ishemijsku ozljedu (3 dana) uočen je značajno manji volumen ishemijske lezije u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa u odnosu na *WT* miševe, što je u skladu sa rezultatima većine prethodnih istraživanja (141, 152, 153). Ukoliko bismo, poput navedenih istraživanja, gledali samo ranu fazu odgovora na ishemijsku ozljedu, mogli bismo zaključiti kako promijenjeni upalni odgovor uzrokovan nefunkcionalnim TLR2 receptorom u početnoj fazi odgovora na ishemijsku leziju ima koristan, tj. zaštitni učinak. Na taj način, aktivacija TLR2 mogla bi se okarakterizirati kao štetan čimbenik koji je potrebno ukloniti (po mogućnosti potpuno), čime bi se postiglo što manje oštećenje mozga nakon nastalog ishemijskog oštećenja. Takav način gledanja je postao ustaljen u literaturi, a inhibicija TLR2 receptora predložena je kao jedan od terapijskih modaliteta u liječenju ishemijskoga oštećenja mozga (141, 152, 153).

Međutim, analizom volumena ishemijske lezije u kasnijim fazama odgovora mozga na ishemijsku leziju, tj. 7 i 14 dana nakon MCAO, dobiveni su iznenađujući rezultati, koji do sada nisu opisani u literaturi. Uočeno je kako se početna neuroprotektivna uloga prikazana u skupini miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom nije održala u kasnijim vremenskim točkama odgovora nakon nastanka ishemijske lezije. Štoviše, u skupini *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa uočeno je povećanje volumena ishemijske lezije u obje vremenske točke (7 i 14 dana). Osim analize volumena ishemijske lezije, proučavan je i opseg neurološkog oštećenja. Slično kao i s rezultatima volumena ishemijskoga oštećenja, neurološki status u ranoj fazi odgovora na ishemijsku leziju (3 dana nakon MCAO) odgovarao je procjenama neurološkog statusa opisanim u prethodnim istraživanjima, u kojima je opisana uloga TLR2 kao štetnog čimbenika u krajnjem ishodu nakon nastanka ishemijske ozljede (141, 152, 153). Međutim, u



skladu s rezultatima procjene volumena ishemijske lezije, u kasnijoj fazi odgovora uočeno je opsežnije neurološko oštećenje u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa u usporedbi sa miševima *WT* skupine.

Osim navedenoga, jedan od ciljeva ovog rada bio je analizirati broj apoptotičnih stanica u skupinama *Tlr2*<sup>-/-</sup> i *WT* miševa u sve tri vremenske točke. Odnos broja apoptotičnih neurona između skupina miševa divljeg tipa i miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom odgovarao je odnosu izračunatih volumena ishemijske lezije (3 dana nakon MCAO uočen je veći volumen lezije, kao i broj apoptotičnih stanica u *WT* miševa, dok je u kasnijim vremenskim točkama taj broj smanjen). Međutim, broj apoptotičnih stanica rastao je tijekom vremena u obje skupine miševa, što se može objasniti procesima cijeljenja (uklanjanje staničnog debrisa i stvaranje glijalnog ožiljka), čime se smanjuje volumen lezije, a bilježi se posljedični porast broja apoptotičnih stanica u takvom, manjem, volumenu lezije. Jedno od objašnjenja povećanog broja apoptotičnih stanica u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa, moglo bi biti stvaranje nepovoljnog mikookoliša uzrokovanog s jedne strane neprimjerenim slijedom događaja u ranoj fazi odgovora mozga na ishemijsko oštećenje, a s druge strane smanjenom razinom neurotrofnog čimbenika IGF-1 koja je zabilježena u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa (opisano u kasnijim odjeljcima). Oba procesa što mogu utjecati na pojačani opseg apoptotskog odumiranja neurona u kasnijoj fazi. Navedeno nam ukazuje kako dinamika odumiranja neurona, razvoja ishemijske lezije i posljedičnog neurološkog oštećenja ovise o prisutnosti funkcionalnog TLR2 receptora, tj. o slijedu patofizioloških događaja koji se odvijaju u podlozi razvoja ishemijskoga oštećenja, a čije su karakteristike (bilo opseg, slijed, trajanje i sl.) ovisne o utjecaju funkcionalnog TLR2 receptora.

Temeljem navedenih rezultata možemo zaključiti kako receptori TLR2 sudjeluju u odgovoru mozga na ishemijsko oštećenje. Uloga receptora TLR2 u odgovoru mozga na ishemijsko reperfuzijsku ozljedu ovisna je o vremenu, tj. ukoliko se promatra rana faza odgovora (u ovom istraživanju 3 dana) učinak je štetan, da bi se u kasnijim fazama odgovora mozga na ishemijsku leziju učinak pokazao korisnim i neophodnim za očuvanje preostalih neurona, što napokon rezultira smanjenim volumenom ishemijske lezije i povoljnijim neurološkim ishodom. Time je hipoteza ove disertacije djelomično potvrđena, sa snažnim naglaskom kako je uloga TLR2 ovisna o vremenu.

## **5.2. Postishemijski upalni odgovor mozga posredovan je TLR2 receptorima izraženima na populaciji stanica mikroglije/makrofaga.**

Jedan od ciljeva ovog rada bio je opisati vremensku i protornu izraženost receptora TLR2 nakon ishemijskoga oštećenja mozga. U dosadašnjim istraživanjima opisano je kako nakon privremene ishemijsko-reperfuzijske ozljede mozga, indukcija TLR2 nadmašuje izražaj ostalih receptora članova porodice TLR, a slijede ju pojačani izražaj receptora TLR4 i TLR9 (153). Slično tome, korištenjem drugih modela, primjerice, nakon ozljede mozga i/ili izlaganja središnjeg živčanog sustava patogenim mikroorganizmima, također dolazi do pojačanog izražaja receptora TLR2 gotovo isključivo na populaciji mikroglijalnih stanica (151, 152, 162, 187). Na taj način definirana je uloga TLR2 kao svojevrsnog nadzora, tj. senzora koji aktivira stanice mikroglije izlaganjem određenim PAMP i DAMP ligandima. Navedeni rezultati suprotstavljeni su nalazima koji opisuju kako su u fiziološkim uvjetima receptori TLR2 izraženi na stanicama mikroglije, ali i na populaciji astrocita, oligodendrocita, neurona i neuroprogenitornih stanica (132, 135, 188, 189). Tu je važno naglasiti kako se u većini navedenih istraživanja uočeni izražaj TLR2 na ostalim staničnim populacijama (osim mikroglije/makrofaga) temeljio se na rezultatima dobivenim u primarnim staničnim kulturama. Naime, u dosadašnjim istraživanjima provedenima *in vivo*, opisano je kako su TLR2 receptori nakon nastanka ishemijskoga oštećenja izraženi na populaciji stanica mikroglije/makrofaga, dok je kolokalizacija sa živčanim stanicama bila opisana u vrlo malom broju stanica (153, 162). Rezultati našeg istraživanja pokazali su značajnu indukciju TLR2 (na razini mRNA i na proteinskoj razini) u ipsilateralnoj hemisferi, i to isključivo u području ishemijske lezije, kao i u periinfarktnom području. Na kontralateralnoj strani (zdrava strana, bez ishemijske lezije) nije uočena indukcija TLR2 signala, što odgovara fiziološkim uvjetima u kojima je razina izražaja TLR2 vrlo niska, ispod razine detekcije. Nadalje, analiza izražaja TLR2 na proteinskoj razini otkrila je kako se, tijekom rane i kasne faze upalnog odgovora mozga na ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje, pojačani izražaj TLR2 javlja gotovo isključivo na stanicama mikroglije/makrofaga. Vrlo mali izražaj uočen je na ograničenoj populaciji neurona smještenih u samoj jezgri ishemijske lezije, dok kolokalizacija sa biljgom astrocita (anti-GFAP protutijelom) nije uočena. Navedeni rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima indukcije TLR2 u uvjetima oštećenja mozga (141, 143, 152, 153, 162, 189, 190). Izražaj receptora TLR2 koji je ograničen uglavnom na populaciju stanica mikroglije/makrofaga ukazuje nam kako receptori TLR2 najvjerojatnije imaju najznačajniju

ulogu upravo u upalnom odgovoru koji se aktivira prilikom odgovora mozga na ishemijsko reperfuzijsku ozljedu, a što je u skladu sa raspoloživom literaturom (141, 144, 150, 152-154).

### **5.3. Aktivacija stanica mikroglije/makrofaga ovisi o funkcionalnom TLR2 receptoru.**

Aktivacija upalnih stanica i posljedična aktivacija prirođenog imunološkog sustava, ključne su komponente upalnog odgovora mozga na ishemijsko oštećenje. Analizom krivulje izražaja *Tlr2* pokazano je kako je mikroglijalna aktivacija udružena sa značajnom dugotrajnom indukcijom receptora TLR2, što nam govori o vjerojatno velikome značaju TLR2 receptora u patofiziološkome slijedu događaja nakon nastanka moždane ishemije. Do danas, u literaturi nije opisano utječe li TLR2 na uzorak aktivacije mikroglijalnih stanica u ranoj i kasnoj fazi (3 i 7 dana) nakon nastanka ishemijske ozljede, i ako da, na koji način. Stoga, jedan od ciljeva ovog rada bio je proučiti u kojoj mjeri dolazi do aktivacije upalnih stanica na mjestu ozljede, te ustanoviti javlja li se promjena u aktivaciji ovisno o prisutnosti funkcionalnog TLR2 receptora.

Rezultati imunobojanja sa Iba1 protutijelom prikazani u ovom istraživanju ukazuju nam kako je aktivacija stanica mikroglije/makrofaga u ranoj i kasnoj fazi odgovora nakon nastanka ishemijskoga oštećenja ovisna o prisutnosti funkcionalnog TLR2 receptora. Naime, u obje skupine miševa nakon nastupa ishemijske ozljede mozga uočen je pojačani intenzitet imunofluorescentnog signala dobivenog obilježavanjem protutijelom anti-Iba1. Uočena pojava se može objasniti povećanim brojem prisutnih stanica (mikroglije ili makrofaga) na mjestu ishemijske lezije, ali i promjenom stupnja aktivacije, tj. posljedičnom promjenom morfologije stanica mikroglije iz razgranatih u "ameboidne", što djelomice ovisi i o prisutnosti TLR2 receptora. U miševa sa onemogućenim TLR2 genom uočeno je smanjenje intenziteta Iba1 signala u obje vremenske točke (3 i 7 dana), što nam govori kako su broj ili stupanj aktivnosti upalnih stanica mikroglije/makrofaga smanjeni kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa, tj. ovisni o funkcionalnom TLR2 genu. Stoga je u nastavku istraživanja provedena analiza upalnog odgovora mozga u smislu analize i usporedbe broja stanica mikroglije, stupnja proliferacije, izražaja pojedinih upalnih citokina, te stupnja privlačenja upalnih stanica iz cirkulacije na mjesto lezije u obje skupine miševa.

#### **5.4. TLR2 sudjeluje u proliferaciji stanica mikroglije, te u regrutiranju upalnih stanica monocita/makrofaga i limfocita iz cirkulacije.**

Prema dosadašnjim spoznajama, pojačana aktivacija i akumulacija stanica mijeloidne loze na mjestu ishemijske ozljede može se pripisati: a) masivnoj proliferaciji rezidentnih mikroglijalnih stanica koje je najizraženije 2-3 dana nakon nastanka ishemijske ozljede, ili b) pojačanom regrutiranju monocita iz cirkulacije na mjesto ozljede (61, 65, 178, 192). U miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom je nakon nastanka ishemijske ozljede mozga uočeno smanjenje Iba1 signala, pa je stoga jedan od ciljeva ovog rada bio ustanoviti i usporediti broj i stupanj proliferacije stanica mikroglije i broja infiltrirajućih monocita/makrofaga, te limfocita između skupina *WT* i *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa u ranoj i kasnoj fazi odgovora nakon MCAO.

U istraživanjima postishemijskog upalnog odgovora dugo vremena je problem predstavljalo razlikovanje rezidentnih stanica mikroglije od stanica monocita/makrofaga koji su došli iz cirkulacije na područje ishemijske lezije, budući da ne postoje stanični biljezi na temelju kojih bi se navedene populacije stanica mogle razlikovati. Međutim, u literaturi je opisano raspoznavanje staničnih populacija monocita/makrofaga metodom protočne citometrije pomoću biljega CD11b i CD45, što je korišteno u ovom istraživanju (88, 89). Prema rezultatima ovog istraživanja, oba procesa su bila zahvaćena, tj. oslabljena u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom, što nam govori kako oba procesa zapravo ovise o funkcionalnosti TLR2 receptora. Uočeno je smanjenje razine kemokina MCP-1 u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa 1 dan nakon nastanka ishemijske lezije zajedno s posljedičnim smanjenjem broja CD45<sup>visoki</sup>/CD11b<sup>+</sup> stanica 3 i 7 dana nakon nastanka ishemijskoga oštećenja. Uz navedeno, u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa uočen je smanjen broj mikroglijalnih stanica, kao i smanjen proliferacijski kapacitet rezidentnih stanica mikroglije u odgovoru na ishemijsko reperfuzijsku leziju. Smanjena proliferacija mikroglijalnih stanica (CD45<sup>niski</sup>/CD11b<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>) uočena je u skupini miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom 3 dana nakon postupka privremene okluzije srednje moždane arterije. Iako ne možemo sa sigurnošću tvrditi kako je smanjeni proliferacijski kapacitet rezidentnih mikroglijalnih stanica uočen 3 dana nakon MCAO uvjetovan inicijalno manjim volumenom ishemijske lezije u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa; povećanje ishemijske lezije u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa u kasnijim vremenskim točkama nije bilo popraćeno porastom mikroglijalne proliferacije i/ili aktivacije. Kao što je prikazano u rezultatima analize stanica protočnom citometrijom, proliferativni odgovor mikroglijalnih stanica ostao je nizak u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa 7

dana nakon izazivanja ishemijske ozljede mozga. S druge strane, smanjeni broj CD45<sup>visoki</sup>/CD11b<sup>+</sup> stanica (infiltrirajući monociti/makrofazi) uočen 3 i 7 dana nakon MCAO, kao i selektivno smanjenje vrijednosti MCP-1 u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa upućuju na mogućnost kako je funkcionalni receptor TLR2 potreban za prikladno regrutiranje monocita iz krvotoka na mjesto lezije. Sveukupno, ovi rezultati djelomično potvrđuju hipotezu uspostavljenu na modelu ozljede aksona gdje je predloženo kako, u akutnoj fazi odgovora na aksonalno oštećenje, TLR2 modulira opseg mikroglijalne proliferacije, dok je utjecaj na regrutiranje monocita iz cirkulacije neovisan o TLR2 signalnom putu (143, 178, 193, 194, 195).

Uz navedeno, rezultati imunohistokemijskog obilježavanja fagosoma protutijelom anti-CD68 u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa ukazali su na smanjenu prisutnost fagocitotske aktivnosti na mjestu ishemijske lezije u miševa s onemogućenim *Tlr2* genom u kasnijim fazama odgovora, tj. 7 dana nakon nastanka ishemijskog oštećenja. Smanjeni broj prisutnih fagosoma upućuje na mogućnost smanjene fagocitotske aktivnosti na mjestu ishemijske lezije, koja je prisutna u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom. Ukoliko je fagocitotska aktivnost uistinu smanjena, navedeno bi moglo rezultirati smanjenim (usporenim) uklanjanjem ostataka odumrlih stanica, i na taj način produljenje trajanja upalne reakcije, što posljedično može imati utjecaja i na krajnji ishod (veličinu ishemijske lezije, apoptotsko odumiranje neurona, te opseg neurološkog oštećenja) (196).

Unatoč tome što konsenzus oko uloge stečene imunosti u patofiziologiji ishemijskog oštećenja mozga još nije uspostavljen, na temelju naših rezultata mogli bi pretpostaviti kako ta uloga ipak postoji. Naime, u području ishemijske lezije u uočene su CD3<sup>+</sup> stanice (odgovaraju limfocitima T). Jedan od stimulusa koji potiče infiltraciju parenhima limfocitima T je i MCP-1. Na taj način snižena razina MCP-1 mogla bi objasniti manji broj limfocita T u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom. Osim MCP-1, postoji još jedno objašnjenje za smanjeni broj limfocita koji je uočen u skupini *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa. Naime, kao što je u uvodnom dijelu spomenuto, dendritičke stanice sudjeluju u prezentaciji antigena limfocitima, a one na svojoj površini također sadrže TLR2 receptore (142), koji im omogućuju prepoznavanje antigena, posljedičnu aktivaciju i prezentaciju antigena. Stoga, u uvjetima nefunkcionalnog TLR2 receptora moguća je također i umanjena funkcija dendritičkih stanica kao predočnih stanica. Kako bismo mogli sa sigurnošću ustvrditi navedene pretpostavke, potrebno je učiniti

dodatna istraživanja koja bi uključivala analizu aktivacije stečenog imunološkog odgovora, te istraživanja na dendritičkim stanicama u *WT* i *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa.

### **5.5. Postishemijska proliferacija rezidentnih stanica mikroglije ovisi o interakciji TLR2 receptora i galektina-3.**

U odgovoru mozga na ishemijsko oštećenje, rezidentne stanice mikroglije proliferiraju i pritom pojačano izražavaju galektin-3 na svojoj površini (65). Galektin-3 ima mnogostruke uloge u brojnim patološkim stanjima, a opisana je moguća uloga u modulaciji prirodnog i stečenog imunološkog odgovora u perifernim upalnim stanicama (179 - 182). U ovome istraživanju potvrđen izražaj galektina-3 na površini proliferirajućih stanica na području ishemijske lezije. Analizom imunofluorescentnog signala dobivenog obilježavanjem ishemičnog tkiva mozga anti-Mac-2 (galektin-3) protutijelom uočen je smanjeni intenzitet signala u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa u odnosu na *WT* miševe. Kako bi se pojasnilo postoji li međusobna povezanost/ovisnost galektina-3 i TLR2, provedeno je mjerenje izražaja *Tlr2* metodom oslikavanja intenziteta bioluminiscentnog signala *in vivo* u skupini miševa divljeg tipa i *Gal3*<sup>-/-</sup> miševa. Rezultati mjerenja signala prikazali su značajno oslabljen izražaj *Tlr2* u *Gal3*<sup>-/-</sup> miševa u odnosu na signal izmjeren u *Wt* miševa. S jedne strane ovaj rezultat mogao bi značiti da galektin-3 možda doprinosi ranoj aktivaciji stanica mikroglije s podljedičnom indukcijom TLR2 odgovora, uzrokujući aktivaciju prirodnog imunološkog sustava. U tom slučaju, možemo pretpostaviti kako galektin-3 ima ulogu u normalnoj i pravovremenoj aktivaciji TLR2 odgovora, kako u prepoznavanju PAMP liganada (191), tako možda i u odgovoru mozga na ishemijsku leziju gdje sudjeluje u aktivaciji prirodnog imunološkog sustava. S druge strane, navedeni rezultat prikazan je u sklopu nedavne publikacije, u sklopu koje je opisano kako se u miševa sa onemogućenim *Gal-3* genom javlja promijenjeni učinak vezanja IGF-1 na receptor IGF-R1, što dovodi do pojačanog izražaja JAK/STAT3 signalnog puta u uvjetima ishemije mozga. Posljedično, pojačani izražaj JAK/STAT3 signalnog puta uzrokuje pojačani izražaj SOCS3 molekule koja djeluje negativnim mehanizmom povratne sprege na molekulu STAT3, posljedično blokirajući povoljni učinak IGF-1 na preživljavanje i na proliferaciju stanica mikroglije (89). Na taj način, uočene promjene signalnog puta u *Gal3*<sup>-/-</sup> miševa djelomično mogu objasniti promjenu mikroglijalne proliferacije opisane u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa. Naime, u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa uočena je smanjena postishemijska sekrecija IGF-1,

potentnog mitogenog faktora mikroglijalnih stanica (184), koje se najvjerojatnije javlja kao posljedica smanjene aktivacije mikroglijalnih stanica uzrokovanog nefunkcionalnim TLR2 receptorom. Uz sniženu razinu IGF-1, za pretpostaviti je kako snižena razina galektina-3 signala može imati dodatni utjecaj na smanjenje proliferacije mikroglijalnih stanica kroz opisani mehanizam djelovanja putem JAK/STAT3 signalnog puta. Opisane mogućnosti rezultat su pregleda raspoloživih rezultata u području istraživanja interakcije TLR2-Galektin-3. Međutim, dodatna istraživanja su potrebna kako bi se točno definirao međudnos TLR2 receptora i galektina-3, s ciljem objašnjenja pravog uzroka smanjene proliferacije stanica mikroglije opisane u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa.

### **5.6. Odgovor mozga na ishemijsku leziju posredovan TLR2 receptorima uzrokuje stvaranje povoljnog mikrookoliša potrebnog za pravilan razvoj lezije**

Pitanje koje se nameće slijedom prikazanih rezultata je: na koji je način promijenjeni odgovor stanica mikroglije/makrofaga uočen u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa povezan sa odgođenim oštećenjem neurona, i posljedično, odgođenim povećanjem ishemijske lezije i pogoršanjem neurološkog statusa.

Jedno od mogućih objašnjenja leži, kao što je u prethodnim istraživanjima i predloženo, u činjenici kako brzo uklanjanje odumrlih ili umirućih stanica sprječava otpuštanje unutarstaničnih komponenti koje djeluju kao DAMP liganadi. Brzo i učinkovito uklanjanje takvih molekula iz područja ishemijske lezije što pridonosi okončanju upalnog procesa (196). Slijedom navedenoga, smanjeni intenzitet CD68 imunoreaktivnosti upućuje na smanjen broj fagosoma prisutnih na mjestu ishemijske lezije u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa, što nam sugerira kako je uklanjanje staničnih ostataka u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa poremećeno, što može pridonijeti produljenom trajanju same postishemijske upalne reakcije. Osim navedenog, važno je obratiti pozornost na vremensku komponentu, budući da je poremećaj aktivacije mikroglije/makrofaga bio najizraženiji upravo 7 dana nakon nastanka ishemijske ozljede, što se podudaralo s povećanjem volumena ishemijske lezije uočenim u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom.

Dodatni odgovor na postavljeno pitanje, kao što je predloženo u prikazanim rezultatima, leži u objašnjenju kako poremećeni prirodni imunološki odgovor uzrokovan nefunkcionalnim

TLR2 receptorom rezultira smanjenom proliferacijom stanica mikroglije, te posljedično smanjenom razinom čimbenika rasta IGF-1. Naime, prethodna *in vitro* i *in vivo* istraživanja pokazala su kako aktivirane i proliferirajuće stanice mikroglije proizvode neurotrofne molekule u koje se ubraja i inzulinu sličan čimbenik rasta – IGF-1 (65, 184). Dokaz biološke važnosti endogeno izlučenog IGF-1 u odgovoru mozga na ishemijsku leziju prikazan je na mišjem modelu u kojemu je selektivno uklonjena populacija proliferirajućih stanica mikroglije (Mac-2 pozitivne stanice). U navedenom mišjem modelu uočeno je značajno smanjenje razine IGF-1 (1,8 puta), što je bilo popraćeno značajnim porastom broja apoptotičnih stanica, gotovo isključivo neurona (65). U ovdje prikazanom istraživanju, u skupini *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa uočeno je smanjenje razine IGF-1, što dijelom objašnjava povećanu apoptozu živčanih stanica uočenu u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom. K tome, snižena razina Mac-2 pozitivnih stanica u skupini *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa ukazuje na snižen broj proliferirajućih stanica mikroglije, što se poklapa sa uočenom sniženom razinom IGF-1 i odgovara navedenim rezultatima prijašnjih istraživanja. Stoga, ovdje prikazani rezultati u skladu su s prije pretpostavljenom anti-apoptotskom i neuroprotektivnom ulogom IGF-1 u odgovoru mozga na ishemijsku leziju (197, 198). Posljedično, snižena razina IGF-1 može dovesti do pojačanog odgođenog odumiranja neurona, što bi moglo objasniti egzacerbaciju ishemijske lezije u kasnijim fazama odgovora uz lošiji rezultat procjene neurološkog statusa dobivenog u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa.

### **5.7. Nakupljanje astrocita na području oko ishemijske lezije smanjeno je u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom.**

U posljednje vrijeme prisutno je sve više dokaza kako astrociti imaju protektivnu ulogu u patofiziološkom slijedu događaja nakon nastanka ishemijske lezije (64, 185). U odgovoru na nastalo ishemijsko oštećenje u okolini lezije dolazi do aktivacije astrocita, do pojave tzv. reaktivnih astrocita koji su obilježeni pojačanim izražajem proteina GFAP prilikom imunohistokemijskog obilježavanja. Protektivna uloga astrocita smještenih u penumbri očituje se u kontroli homeostaze vode, ionskog sastava te prisutnog glutamata kao i u uklanjanju nastalih slobodnih kisikovih radikala. Na taj način astrociti osiguravaju povoljan milje potreban za opstanak neurona. Sukladno tome, poremećena funkcija astrocita udružena je s povećanim propadanjem neurona (64). Osim navedene uloge, astrociti imaju važnu



zadaću ograničavanja ishemijske lezije na način da nakon aktivacije započinju stvaranje astroglijalnog ožiljka. Ukoliko je navedena reaktivna astroglioza narušena, u uvjetima ishemije opisana je pojava povećanog volumena nastale ishemijske lezije (185).

Budući da je u ovom radu uočeno povećanje ishemijske lezije u kasnijim fazama odgovora mozga na ishemijsku leziju u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa, provedeno je mjerenje intenziteta signala dobivenog obilježavanjem GFAP protutijelom. U našem istraživanju uočen je oslabljen intenzitet GFAP signala prisutnog u okolini ishemijske lezije u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa. Navedeni rezultat nam sugerira kako je moguće da aktivacija astrocita i nakupljanje astrocita nakon nastanka ishemije ovise o TLR2 receptorima. Navedena pojava bi se mogla objasniti razvojem nepovoljnog mikrookoliša uslijed neodgovarajuće i nepravovremene aktivacije upale, što posljedično neadekvatno aktivira astrocite, te najvjerojatnije pridonosi neodgovarajućem stvaranju glijalnog ožiljka i posljedičnom povećanju izravnog volumena ishemijske lezije. Međutim, treba imati na umu da je u primarnoj kulturi astrocita opisan izražaj TLR2 receptora na površini stanica astroglije (136). Unatoč tome što izražaj TLR2 nije *in vivo* opisan na površini astrocita, uočava se potrebna za daljnjim istraživanjima koja bi opisala potencijalnu povezanost receptora TLR2 i aktivacije astrocita, s ciljem definiranja radi li se o izravnom ili posrednom učinku TLR2 na aktivaciju stanica astroglije.

### **5.8. TLR2 posredovani upalni odgovor moguće je modulirati pomoću dijete bogate omega-3 nezasićenim masnim kiselinama, što rezultira zaštitnim učinkom.**

Na temelju prikazanih rezultata možemo zaključiti kako je u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom postishemijski upalni odgovor nepravovremeno i neadekvatno aktiviran i reguliran, što posljedično rezultira povećanim volumenom ishemijske lezije kao krajnjim ishodom u oporavku mozga nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede. Navedeno nam govori kako je pravovremeni i odgovarajući odgovor nužan za normalnu rezoluciju upale i posljedično ograničavanje opsega ishemijske lezije.

S druge strane, uočeno je kako konzumacija ribe smanjuje rizik nastanka moždanog udara, kao i infarkta miokarda, a opisani učinak se pripisuje omega-3 nezasićenim masnim kiselinama, posebice DHA. U jednom dijelu ovog istraživanja proučavan je utjecaj DHA na opseg TLR2-posredovanog upalnog odgovora uz provedenu analizu krajnjeg učinka, tj. procjenu veličine nastale ishemijske lezije, što je publicirano u (168). Prikazani učinak DHA

na smanjeni opseg aktivacije TLR2 posredovanog upalnog odgovora naizgled govori o upali kao o štetnom čimbeniku u patofiziološkom slijedu događaja koji slijede nakon nastanka moždane ishemije. Međutim, ovdje je važno naglasiti kako se radi o miševima koji imaju funkcionalni TLR2 receptor, a upala i opseg oštećenja modulirani su na "višim" razinama, primjerice, mijenjanjem odnosa omega-3/omega-6 nezasićenih masnih kiselina u mozgu.

Naime, uz navedene rezultate, provedena je detaljna analiza učinaka DHA, te je ustanovljeno kako primjena omega-3 nezasićene masne kiseline DHA može promijeniti ukupni sastav masnih kiselina u mozgu, što posljedično utječe na kompeticiju omega-3 i omega-6 nezasićenih masnih kiselina u procesu sinteze prostaglandina na razini enzima ciklooksigenaze i lipoksigenaze. DHA suprimira funkciju COX-2, dok arahidonska kiselina pojačava istu. Stoga, promjenjeni ukupni sastav nezasićenih masnih kiselina u korist omega-3 nezasićenih masnih kiselina posljedično rezultira smanjenom aktivnošću COX-2 u patofiziološkom slijedu događaja nakon nastanka ishemijskoga oštećenja mozga, te djelomično objašnjava uočeni protuupalni učinak DHA. Ta je pojava objašnjena je na sljedeći način: oštećenje stanica u uvjetima ishemije rezultira masivnim otpuštanjem slobodnih masnih kiselina, uključujući arahidonsku kiselinu i DHA iz membranskih fosfolipida. Među navedenim medijatorima upale, razgradnjom nastaju također derivati DHA u koje se ubrajaju neuroprotektin-1 i rezolvin, koji pokazuju snažan neuroprotektivni učinak. Navedeni derivati pak posreduju u učinku DHA na COX-2 enzim i povisuju izražaj Bcl-2, što posljedično rezultira željenim antiapoptotskim učinkom (168).

Dakle, za normalan slijed događaja nakon nastanka ishemije mozga potreban nam je funkcionalan i pravovremeni postishemijski upalni odgovor, kako bi se širenje lezije na vrijeme ograničilo i kako bi posljedično oštećenje bilo što manje. Uz navedeno, treba imati na umu da je neuroprotektivni učinak DHA postignut na način da se u uvjetima ishemije stvara povoljniji mikrookoliš u kojemu je preživljavanje neurona izglednije. Ovakvim pogledom na ulogu postishemijskog upalnog odgovora mijenja se shvaćanje uloge upale kao nužno jednoznačne, dobre ili loše, u slijedu događaja koji se odvijaju nakon nastanka ishemijske ozljede mozga.

## 5.9. Terapijski pristup ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi mozga

Razvoj terapije ishemijskoga oštećenja mozga predstavlja veliki izazov za mnoge istraživačke skupine. Glavni cilj u terapiji ishemijskog moždanog udara uzrokovanog ugruškom bio je pronaći način kako što prije uspostaviti protok krvi u zahvaćenom području. Do danas, tromboliza rekombinantnim tkivnim aktivatorom plazminogena (rtPA) je jedini odobreni terapijski pristup. Međutim uzak terapijski prozor u trajanju od 4,5h od trenutka nastanka začepjenja krvne žile ograničava primjenu rtPA na nešto manje od 5% ljudi oboljelih od ishemijskog moždanog udara (8). Stoga, jasna je potreba za razvojem drugih terapijskih modaliteta koji bi obuhvatili većinu bolesnika koji ne mogu biti podvrgnuti terapiji rtPA, bilo zbog uskog terapijskog prozora, bilo zbog kontraindikacija za primjenu rtPA. Do danas, razvoj terapije ishemijskoga oštećenja mozga temeljen je na principu moduliranja pojedinih komponenata odgovora mozga na ishemijsku leziju.

U skladu s time, razvijeni su brojni eksperimentalni terapijski pristupi koji djeluju na način da, primjerice, moduliraju upalni odgovor mozga na ishemijsku ozljedu. Prednosti takvog pristupa su: prvo, terapija kojom bi se modulirao imunološki odgovor ima prošireni vremenski prozor nakon nastanka ozljede koji traje između 12 i 24 sata nakon nastanka ishemijske ozljede (199, 200), pa bi na taj način bilo obuhvaćeno znatno više bolesnika nego što je to moguće primjenom trombolitičke terapije; drugo, suprimiranje upalnog odgovora prikazano je kao koristan pristup i u modelima moždanog krvarenja (201), što čini veliku prednost prilikom odlučivanja kojim bolesnicima dati terapiju, a kojima ne, kao što je to slučaj sa primjenom rtPA. Na taj način, odluka o primjeni terapije bila bi znatno olakšana i brža u jedinicama hitnog prijema zdravstvenih ustanova. Treće, upalni odgovor ima značajnu ulogu u reperfuzijskom oštećenju tkiva (202, 203), stoga bi primjena takvog sredstva predstavljala korisnu nadopunu terapiji primjenom rtPA ili intravaskularnom uklanjanju tromba, u bolesnika koji su na vrijeme pristigli u zdravstvenu ustanovu (unutar 4,5h od trenutka nastanka ishemijske ozljede).

Primjeri terapijskih intervencija koje su predložene u literaturi su: djelovanje na strukture koje sudjeluju u iniciranju upalnog odgovora mozga (primjerice inhibicijom pojedinih TLR receptora), djelovanje na brojne medijatore upale (brojni citokini i kemokini), komponente komplementa, adhezijske molekule, enzime koji sudjeluju u upali, čimbenike rasta itd. (vidi

prilog - dopunska tablica u radu (45)). Pregledom provedenih istraživanja koja su bila usmjerena prema modulaciji pojedinih komponenti upalnog odgovora uočava se kako su sva istraživanja (osim vrlo rijetkih iznimki) usmjerena isključivo na ranu fazu postishemijskog upalnog odgovora, tj. proučavan je najčešće utjecaj manipulacije na ishod u prva tri dana nakon nastupa ishemijske ozljede. Upravo se u tom kontekstu vidi najveći znanstveni doprinos ove disertacije, koja govori kako je ključno proučavanje obje, rane i kasne faze odgovora mozga na ishemijsku leziju, budući da postishemijski upalni odgovor podrazumijeva prostorni, ali i još važnije, vremenski kontinuum koji obuhvaća isprepletene procese koji su navedeni i objašnjeni u uvodnom dijelu. Stoga, za očekivati je kako će poremećaj uzrokovam manipuliranjem jedne komponente akutne faze imati također utjecaja na razvoj lezije i u kasnijoj fazi odgovora na ishemijsku ozljedu mozga. Istraživanje prikazano u ovoj disertaciji je upravo zbog toga još i zanimljivije, budući da se u literaturi počinje govoriti i pretkliničkim ispitivanjima pojedinih terapijskih pristupa, bez prethodno provedenih iscrpnih analiza krajnjeg ishoda kako u ranim, tako i u kasnijim vremenskim točkama nakon nastanka ishemijske ozljede.

Uz navedeni pristup, u eksperimentalnim ispitivanjima nalazi se i primjena RTL liganada (engl. *RTL - Recombinant T cell receptor Ligand*) koji se vežu za TCR, a djeluju kao parcijalni agonisti MHC-II molekula, te uzrokuju skretanje autoreaktivnih limfocita T (primjerice, na mijelin) prema neinflamatornim oblicima, koji pojačano izlučuju IL-10 i TGF- $\beta$  (204). Istraživanje je provedeno u vremenskom periodu 4 dana nakon MCAO. Navedeni pristup se trenutno nalazi u prekliničkoj fazi ispitivanja.

Jedan od zanimljivih koncepata u terapijskom pristupu je ujedno i stimulacija neuroprotektivne uloge regulatornih limfocita T primjenom IL-10 u obliku injekcije u moždane komore, što je izazvalo zaštitni učinak nakon nastanka ishemijske ozljede. Učinak je promatran u više vremenskih točki, do 7 dana nakon MCAO (205). Navedeni koncept/pristup se također trenutno nalazi u prekliničkoj fazi ispitivanja.

Međutim, pod utjecajem eksperimentalnih istraživanja postishemijskog odgovora mozga na uočeno je kako se mozak na natalo ishemijsko oštećenje brani kompleksnim slijedom događaja – tzv. endogenom neuroprotekcijom (poglavlje 1.2.). Sukladno tome, u posljednje vrijeme je terapijski pristup usmjeren prema istovremenom moduliranju više komponenata

odgovora, a ne samo prema moduliranju jednog medijatora upale ili djelovanjem na jednu vrstu stanica. Navedenim pristupom očekuje se postizanje kontroliranog učinka, koji će biti što sličniji lokalnim i udaljenim mehanizmima endogene neuroprotekcije (53).

Terapijski pristupi koji se trenutno nalaze u kliničkoj fazi ispitivanja, obuhvaćaju terapiju: a) minociklinom; b) hematopoetskim čimbenicima rasta (uključujući eritropoetin, G-CSF, GM-CSF); c) hipotermijom; te d) udaljenim prekondicioniranjem primjenom ishemije jednog uda. Minociklin je antibiotik koji pripada skupini tetraciklina, a ima izražen antiapoptotski, protuupalni i anti-ekscitotoksični učinak, sa širokim terapijskim prozorom primjene (206). Unatoč tome što patofiziološki mehanizam djelovanja još nije do kraja razjašnjen, učinak minociklina predstavlja primjer multimodalnog učinka koji oponaša djelovanje endogene neuroprotekcije. Prema eksperimentalnim istraživanjima, minociklin djeluje neuroprotektivno na način da snižava razinu HMGB1, snižava aktivnost mikroglijalnih stanica (207), a djeluje i na smanjenje glutamatne ekscitotoksičnost, što rezultira smanjenim apoptotskim odumiranjem stanica (208). Do danas, primjena minociklina pokazala se korisnom u manjim kliničkim istraživanjima, a trenutno se planira ulazak u treću fazu velikih kliničkih ispitivanja. Minociklin je preporučeno davati u kratkom vremenskom periodu, a ukoliko se daje zajedno sa rtPA, produžuje se terapijski prozor i smanjuje se učestalost krvarenja, što rezultira dodatnim korisnim učinkom u bolesnika koji primaju rtPA (45, 206).

Hematopoetski čimbenici rasta (uključujući eritropoetin, G-CSF, GM-CSF) djeluju antiapoptotski, protuupalno, te potiču angiogenezu i neurogenezu na životinjskom modelu, što rezultira neuroprotektivnim učinkom (48, 209). Eritropoetin se pokazao korisnim u manjim kliničkim istraživanjima, dok je u velikim kliničkim ispitivanjima opisana neučinkovitost, pa čak i štetan učinak. Međutim, ne-hematopoetski analozi eritropoetina pokazali su obećavajući učinak na eksperimentalnim modelima. Trenutno se ispituje štetnost eritropoetina na skupini bolesnika koji su oboljeli od moždanog udara. Čimbenik G-CSF je također pokazao potencijalna terapijska svojstva, a klinička ispitivanja se upravo odvijaju (45, 209).

Hipotermija djeluje neuroprotektivno prilikom nastanka ishemijskoga oštećenja mozga, što posljedično rezultira manjom lezijom u eksperimentalnom modelu ishemijske ozljede mozga (210). Iako je točan mehanizam kojim hipotermija djeluje neuroprotektivno u čovjeka još uvijek nepotpuno istražen, u eksperimentalnim uvjetima opisan je učinak hipotermije na

smanjenje ekscitotoksičnosti, upale, apoptoze, te poticanje uspostave tkivne homeostaze na način da dolazi do pojačanog stvaranja čimbenika rasta i proteina upale koji djeluju citoprotektivno i potiču reparativne procese. Do sada, provedeno je istraživanje izvedivosti i sigurnosti na bolesnicima. Zaključak je kako je izazivanje blage hipotermije (33°C) u bolesnika koji primaju rtPA izvedivo, međutim nosi određene komplikacije, kao što je učestalija pojava pneumonije, te malignog moždanog edema tijekom ponovnog zagrijavanja tijela bolesnika (211). Klinička ispitivanja učinkovitosti primjene hipotermije u ljudi trenutno su u pripremljivoj fazi (45).

Uz navedene postupke, u literaturi su opisani i postupci udaljenog post-kondicioniranja primjenom postupka izazivanja ishemije jednog uda (212). Unatoč nejasnom mehanizmu djelovanja navedenog postupka, u eksperimentalnim uvjetima opisano je kako se nakon pre/postkondicioniranja aktiviranju kompleksni stanični signalni putevi koji dovode do pojačane tolerancije na hipoksiju/ishemiju. Promjene u razinama bjelancevinskih kinaza, transkripcijskih i translacijskih puteva omogućavaju promjenu homeostaze u stanje koje je refrakerno na ishemijske izazove (213). U literaturi je opisano smanjenje ishemijskog oštećenja mozga ukoliko se postupak primjeni nakon nastanka ishemijske ozljede u štakora (212). Prednost postupka je sigurnost prilikom primjene, jednostavnost, i niski troškovi. Ispitivanje izvedivosti, efikasnosti i potencijalnih opasnosti prilikom i nakon primjene potrebno je dodatno istražiti.

U odlomcima iznad navedena su dva aktualna terapijska pristupa ishemijskoj ozljedi mozga; unimodalni – pristup u kojem se intervencija temelji na moduliranju jedne komponente kompleksnog odgovora na ishemijsku ozljedu mozga; i multimodalni – primjena jedne intervencija koja mijenja kompleksan sustav pato/fizioloških događaja u mozgu nakon nastanka ishemije s ciljem postizanja učinka koji je što sličniji endogenoj neuroprotekciji. Oba terapijska principa imaju svoje prednosti, ali za njihovo razumijevanje je potrebno najprije definirati kompleksni prostorni i vremenski slijed događaja u kojega su uključene brojne stanične populacije, te medijatori upale. Ukoliko bi se slijed događaja jasno definirao svojom prostornom i vremenskom komponentom, u idealnim uvjetima, kombinacije ovih pristupa bile bi moguće. Na taj način bi i multimodalni pristup trebalo analitički istraživati, a u tom kontekstu istraživanje prikazano u ovoj disertaciji ima još značajniju, konceptualnu ulogu, budući da je za shvaćanje kompleksnog mehanizma (kao što je endogena neuroprotekcija) najprije potrebno do detalja razumijeti pojedine komponente sustava

(receptori, medijatori, citokini i kemokini koji sudjeluju u upali) i to u prostornom, ali i vremenskom slijedu, poštivajući njihovu uzajamnu povezanost/ovisnost. Stoga, ovo istraživanje, osim što definira ulogu receptora TLR2 u odgovoru mozga na ishemijsko oštećenje, predstavlja dodatni znanstveni doprinos, budući da usmjerava proučavanje odgovora mozga na ishemijsku ozljedu, kao i proučavanje učinka pojedinih uni/multi-modalnih terapijskih oblika i na kasnije faze odgovora.

### **5.10. Dvostruka uloga upale u ishemijskoj ozljedi mozga**

U posljednjih nekoliko godina zabilježen je značajan napredak u razumijevanju uloge upale u patofiziologiji ishemijsko-reperfuzijske ozljede mozga. U literaturi trenutno postoje brojni izvještaji koji predstavljaju upalu kao štetan čimbenik u odgovoru mozga na ishemijsko oštećenje. S druge strane, mehanizmi koji se aktiviraju uslijed nastale upalne reakcije djeluju u kasnijim fazama odgovora na zaštićen, tj. koristan način, potičući procese regeneracije i plastičnosti mozga (74, 76). Tako su u literaturi raspoloživi rezultati koji opisuju štetnu ulogu proupalnih citokina koji se oslobađaju uslijed aktivacije upalne reakcije nakon nastanka ishemijske ozljede. Primjerice, opisana je povezanost povišene razine citokina IL-6 koje su s težim oblicima moždanog udara (214, 215). Slijedom takvog razmišljanja, korišteni su raznovrsni pristupi, primjerice onemogućavanje oslobađanja endogenog TNF- $\alpha$ , što je rezultiralo smanjenjem opsega ishemijskog oštećenja u štakora (216). Osim navedenog, injiciranje proupalnog citokina IL-1 $\beta$  u moždane komore uzrokovalo je povećanje (217), a davanje antagonista IL-1 $\beta$  smanjenje (218, 219) veličine ishemijske ozljede u štakora. U skladu s time, davanje antibiotika minociklina, kao i inhibitora ciklooksigenaze djelovalo je protektivno u uvjetima eksperimentalne ishemije mozga (220, 221). Jednako tako, s druge strane nalaze se istraživanja koja pokazuju na kako upala nema, odnosno ima koristan učinak u na oporavak nakon nastalog ishemijskoga oštećenja mozga. Primjerice, na miševa s onemogućenim genom *IL-6* koja pokazuju kako citokin IL-6 nema izravan učinak na veličinu ishemijske lezije i neurološkog deficita (222) ili pak rezultira značajno većim ishemijskim lezijama, većom smrtnosti, te lošim funkcionalnim ishodom, što je prikazano na modelima ishemijske ozljede mozga, retinalne ishemije i traumatske ozljede mozga (223 - 226). Također, u literaturi je opisan i koristan učinak TNF- $\alpha$  u ranoj fazi odgovora na ishemijsku leziju (61, 227). Rezultati ovih istraživanja ukazuju na moguću neuroprotektivnu ulogu

citokina i upale u patofiziologiji oštećenja mozga (228). Kao dodatak ovoj raspravi treba dodati kako stanice mikroglije proizvode i izlučuju razne čimbenike rasta, primjerice IGF-1, BDNF (65), koji sudjeluju u procesima regeneracije i plastičnosti mozga (228). Navedeni podaci nam govore kako s jedne strane postishemijska upala doprinosi razvoju ishemijske lezije (ovisno o istraživanoj komponenti upalnog odgovora učinak je koristan ili štetan), a u kasnijim fazama potiče procese regeneracije i plastičnosti mozga.

Temeljem rezultata ovog istraživanja, ali i prethodnih istraživanja koja su proučavala ulogu upale u dogovoru mozga na ishemijsko oštećenje čini se kako je potrebno "zadržati" imunološki odgovor nakon nastalog oštećenja, kako bi se aktivirali zaštitni mehanizmi koji bi pogodovali procesima neovaskularizacije i regeneracije. Gledajući iz teorijskog kuta, optimalna terapija obuhvaćala bi inhibiciju upalnog odgovora u ranom periodu nakon nastanka ishemijske upale, dok bi aktivacija upalnog odgovora u kasnijim fazama pogodovala procesima neovaskularizacije, plastičnosti i regeneracije (74, 76). Međutim, pritom treba imati na umu kako se u stvarnosti radi o kontinuitetu procesa i iznimno složenoj mreži interakcija koje se odvijaju od prve sekunde nastanka ishemijske ozljede mozga, a koje se protežu (povezanim procesima) kroz duži vremenski period koji može trajati i više mjeseci. Stoga, u stvarnosti, ispravan pristup bio bi najprije provesti detaljne analize prostorne i vremenske dinamike događaja koji slijede nakon nastanka ishemijske ozljede mozga. Zatim ispitati kakav utjecaj imaju pojedini unimodalni pristupi koji mijenjaju samo jednu komponentu upalnog odgovora, a onda kombiniranim učinkom takvih intervencija modulirati upalni odgovor kako bi se izbjegle štetne posljedice upale, a zadržale one korisne.

Na kraju, važno je napomenuti kako prilikom istraživanja primjene pojedinih modulatora upalnog odgovora treba kritički uzeti u obzir sve parametre izvođenja istraživanja, kako bi se uočio pravi učinak promatrane komponente. Iznimnu pozornost treba usmjeriti na vremensku komponenta, tj. učinak primjene određene terapije može imati različit, a i posve obrnut učinak ukoliko se primjeni prije ili nakon nastanka moždane ishemijske (74). U prilog navedenome važan znanstveni doprinos predstavlja i ovo istraživanje u kojemu je opisano kako je uloga receptora TLR2 ovisna o vremenu koje je proteklo od nastanka ishemijsko-reperfuzijske ozljede mozga.



## **6. ZAKLJUČCI**

### **1. Receptori TLR2 sudjeluju u odgovoru mozga na ishemijsko oštećenje.**

U ovome istraživanju proučavana je uloga TLR2 receptora usporedbom postishemijskog odgovora mozga u skupinama miševa divljeg tipa i miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom. Budući da se opisani odgovor mozga na ishemijsku leziju značajno razlikuje između navedenih skupina, možemo zaključiti kako receptori TLR2 sudjeluju u odgovoru mozga na ishemijsko oštećenje, čime se potvrđuje prvi dio hipoteze navedene u ovoj disertaciji.

### **2. Učinak prisutnosti TLR2 receptora u odgovoru mozga na ishemijsku leziju ovisan je o vremenu. U ranoj fazi odgovora učinak je štetan, dok je u kasnijoj fazi i krajnjem ishodu učinak zaštićen.**

Drugi dio hipoteze ovog istraživanja, kako TLR2 receptori imaju izražen zaštitni učinak u odgovoru mozga na ishemijsku leziju, uvjetno je potvrđen. Naime, u ranoj fazi odgovora mozga na ishemijsku leziju uočeno je privremeno povećanje volumena ishemijske lezije u miševa koji su imali funkcionalan TLR2 receptor, što je bilo popraćeno lošijim neurološkim statusom. Međutim, u kasnijim fazama odgovora receptori TLR2 pokazali su se neophodnima za adekvatan odgovor mozga na ishemijsku leziju, što je rezultiralo manjim volumenom ishemijske lezije, smanjenim brojem apoptotičnih živčanih stanica, te boljim neurološkim statusom u miševa divljeg tipa u odnosu na miševe u s onemogućenim *Tlr2* genom.

### **3. Postishemijski upalni odgovor mozga posredovan je TLR2 receptorima izraženima na populaciji stanica mikroglije/makrofaga.**

U fiziološkim uvjetima razina TLR2 u mozgu je ispod razine detekcije. Uslijed nastale ishemijsko-reperfuzijske ozljede mozga dolazi do pojačanog izražaja receptora TLR2 na populaciji stanica mikroglije/makrofaga smještenih u središtu ishemijske lezije, kao i u zoni penumbre. Uočeni izražaj bio je jasno izražen u ranoj i kasnoj fazi odgovora mozga na ishemijsku leziju.

#### **4. Aktivacijski profil mikroglije/makrofaga ovisi o funkcionalnom TLR2 receptoru.**

Uloga receptora TLR2 u aktivaciji stanica mikroglije bila je istražena na skupini miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom. Nedostatak funkcionalnog TLR2 receptora uzrokovao je smanjenu aktivaciju stanica mikroglije u ranoj fazi odgovora na ishemijsku leziju. U kasnoj fazi odgovora i dalje je postojala smanjena aktivacija koja je bila udružena sa smanjenom fagocitotskom aktivnošću na području ishemijske lezije, što je vjerojatno utjecalo na naknadno povećanje ishemijske lezije.

#### **5. Broj i stupanj proliferacije rezidentnih stanica mikroglije pod utjecajem su funkcionalnog TLR2 receptora.**

U ovome istraživanju uočeno je kako su proliferacija i broj prisutnih mikroglijalnih stanica na i oko mjesta lezije ovisni su o prisutnosti funkcionalnog *Tlr2* gena u ranoj i u kasnoj fazi odgovora na nastalo ishemijsko oštećenje. Navedena zapažanja sugeriraju kako neadekvatna aktivacija mikroglije rezultira poremećajem proliferacije rezidentnih stanica mikroglije.

#### **6. Infiltracija monocita i limfocita iz cirkulacije na mjesto ishemijskoga oštećenja ovisi o prisutnosti TLR2 receptora.**

Temeljem rezultata ovog istraživanja, možemo zaključiti kako proces regrutiranja monocita i limfocita T iz cirkulacije na mjesto ishemijskoga oštećenja ovisi o prisutnosti funkcionalnog TLR2 receptora. Naime, u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom uočen je smanjen broj monocita i limfocita prisutnih na mjestu ishemijskog oštećenja, moguće kao posljedica istovremenog smanjenja izlučenog kemokina MCP-1. Uz sniženu razinu CD68 signala koji reflektira opseg fagocitotske aktivnosti na mjestu lezije, za pretpostaviti je kako smanjeni broj upalnih stanica na mjestu lezije doprinosi povećanju ishemijske lezije u kasnijim fazama odgovora mozga na ishemijsko oštećenje koje je opisano u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa.

## **7. Odgovor mozga na ishemijsku leziju posredovan TLR2 receptorima uzrokuje stvaranje povoljnog mikrookoliša potrebnog za pravilan razvoj lezije**

Izlučivanje čimbenika rasta IGF-1 koji ima potentan neuroprotektivan i antiapoptotski učinak sniženo je u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa. Prema podacima iz literature, snižena razina IGF-1 može djelovati štetno na neurone prisutne na mjestu ishemijskoga oštećenja, povećavajući oštećenje nastalo ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom. Smanjena sekrecija neuroprotektivnog i antiapoptotskog čimbenika rasta IGF-1 najvjerojatnije pridonosi odgođenom razvoju ishemijske lezije i odgođenoj apoptozi neurona opisanoj u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom.

## **8. Nakupljanje astrocita na području oko nastale ishemijske lezije smanjeno je u miševa sa onemogućenim TLR2 genom.**

Jedan od rezultata ovog istraživanja je ovisnost nakupljanja astrocita na rubnom području oko ishemijske lezije o prisutnosti funkcionalnog TLR2 receptora. Smanjeno nakupljanje/aktivacija se najvjerojatnije javlja kao posljedica promijenjenih događaja u ranijim fazama odgovora mozga na ishemijsku leziju. Uočeno smanjenje reaktivnosti astrocita u miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom najvjerojatnije pridonosi kasnijem povećanju izravnog volumena ishemijske lezije prisutnog u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa.

## **9. TLR2 posredovani upalni odgovor moguće je modulirati pomoću dijeta bogate omega-3 nezasićenim masnim kiselinama, što rezultira zaštitnim učinkom.**

Dijeta bogata omega-3 nezasićenom masnom kiselinom DHA primjer je kako djelovanje na postishemijski upalni odgovor posredovan TLR2 receptorom na drugim razinama (primjerice mijenajanjem omjera omega-3/omega-6 nezasićenih masnih kiselina, inhibicijom COX-2 itd.) može pružiti neuroprotektivan učinak, ali uz prisutnost funkcionalnog TLR2 receptora.

## **10. Nedostatkom funkcionalnog TLR2 receptora poremećena je orkestracija imunološkog odgovora nakon nastanka ishemijskog oštećenja**

U miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom uočene su promjene u stupnju aktivacije stanica mikroglije/makrofaga; promjene u regrutiranju  $CD11b^+/CD45^{\text{visoki}}$  (perifernih) stanica iz cirkulacije na mjesto ozljede; te smanjen broj  $CD3^+$  stanica (limfociti T) prisutnih na mjestu ishemijske lezije, uz promjene u aktivaciji/nakupljanju astrocita nakon ishemijskog oštećenja. Navedeno nam govori kako je TLR2 nužan za adekvatnu orkestraciju odgovora mozga na ishemijsku leziju.

## 7. SAŽETAK

U odgovoru mozga na ishemijsko oštećenje aktivira se niz patofizioloških procesa među kojima upala ima vrlo važno mjesto. Glavni izvršitelji prirodnog upalnog odgovora u mozgu su stanice mikroglije na kojima uslijed aktivacije dolazi do pojačanog izražaja receptora TLR2, koji perzistira dugo vremena nakon nastanka ishemijske lezije. Uloga receptora TLR2, izuzevši od prije poznatu ulogu u akutnom prirodnom imunološkom odgovoru kao i štetnu ulogu u ranoj fazi nastanka ishemijske lezije, nije još uvijek razjašnjena.

U prikazanom istraživanju, miševima sa onemogućenim *Tlr2* genom, kao i miševima divljeg tipa izazvana je ishemijsko-reperfuzijska ozljeda mozga postupkom privremene okluzije srednje moždane arterije (MCAO). Nakon različitih reperfuzijskih perioda procjenjena je sposobnost aktivacije stanica mikroglije/prirodnog imunološkog odgovora metodama hibridizacije RNA *in situ*, imunohistokemijskim analizama, protočnom citometrijom, te analizom izražaja proupalnih citokina u obje skupine miševa. Utjecaj receptora TLR2 na razvoj ishemijske ozljede mozga proučavan je metodama procjene veličine ishemijske lezije, apoptotskog odumiranja stanica, te neurološkog ispada u obje skupine miševa, u ranoj i kasnoj fazi odgovora mozga na ishemijsku leziju.

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju hipotezu kako receptori TLR2 sudjeluju u upalnom odgovoru mozga na ishemijsko oštećenje, dok je uloga receptora TLR2 ovisna je o vremenu nakon nastanka ishemijske ozljede. Naime, u ranoj fazi (3 dana) odgovora na ishemijsku leziju uloga se čini privremeno štetnom, da bi u kasnijim vremenskim točkama bio uočen zaštitni učinak. U skupini miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom opisana je smanjena aktivacija mikroglijalnih stanica, smanjen proliferativni kapaciteta mikroglije, snižena razina kemokina MCP-1, te snižen broj CD45<sup>visoki</sup>/CD11b<sup>+</sup> stanica na mjestu lezije. U *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa također je uočena snižena razina neurotrofnog/antiapoptotskog čimbenika IGF-1, te smanjena reaktivnost astrocita. Uočene promjene prirodnog imunološkog sustava bile su izraženije u kasnijim vremenskim točkama (7 dana) nakon nastanka moždanog udara, što je doprinjelo odgođenom povećanju volumena ishemijske lezije u *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa u odnosu na miševu divljeg tipa.

Zaključno, rezultati istraživanja prikazuju kako receptori TLR2 sudjeluju u modulaciji odgovora mozga na ishemijsko oštećenje, čime se postiže optimalna i pravovremena aktivacija stanica mikroglije, što u kasnijem slijedu događaja omogućuje pravilan razvoj ishemijske lezije i posljedično manje neuronalno oštećenje uzrokovano moždanim udarom.

## **8. SUMMARY**

Brain response to ischemic injury involves activation of various pathophysiological events, among which inflammation plays prominent role. Main effectors of innate immune response in brain are microglial cells, whose activation after stroke is characterized by marked and long-term induction of the receptor TLR2. However, the role of TLR2, beyond acute innate immune response and detrimental role in early ischemic injury remained not well understood. In this research, the *Tlr2*<sup>-/-</sup> mice were subjected to transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by different reperfusion times. Analyses assessing microglial activation profile/innate immune response were performed using in situ hybridization, immunohistochemistry analysis, flow cytometry and inflammatory cytokine array. The effects of the *Tlr2* deficiency on the evolution of ischemic brain injury were analyzed using a cresyl violet staining of brain sections with appropriate lesion size estimation as well as neurological scoring in several time points after stroke.

In this research it is shown that TLR2 plays important role in modulation of postischemic inflammatory response. Results of this study suggest time-dependent role of TLR2 in brain response to ischemic injury. Namely, the role of TLR2 in early phase of response to ischemic lesion seems detrimental, while in later phases effect of TLR2 response seems beneficial. Namely, *Tlr2* deficiency markedly affects post-stroke immune response resulting in delayed exacerbation of the ischemic injury. The temporal analysis of the microglia/macrophage activation profiles in *Tlr2*<sup>-/-</sup> mice and age-matched controls revealed reduced microglia/macrophage activation after stroke, reduced capacity of resident microglia to proliferate as well as decreased levels of MCP-1 and consequently lower levels of CD45<sup>high</sup>/CD11b<sup>+</sup> expressing cells as shown by flow cytometry analysis. Moreover, our results revealed that *Tlr2* deficiency is associated with significant decrease in the levels of neurotrophic/antiapoptotic factor IGF-1, and reduced astrocyte response following stroke. Importantly, although acute ischemic lesions (3 days) were smaller in *Tlr2*<sup>-/-</sup> mice, the observed alterations in innate immune response were more pronounced at later time-points (at day 7) after initial stroke, which finally resulted in delayed exacerbation of ischemic lesion leading to larger chronic infarctions as compared to *WT* mice.

Altogether our results clearly suggest that optimal and timely TLR2-mediated microglial activation/innate immune response is needed to limit neuronal damage after stroke.

## **9. POPIS LITERATURE**

1. Atlas of Heart Disease and Stroke, WHO, CDC, 2002. [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/resources/atlas/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/).
2. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM i sur. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics--2012 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2012;125:e2-e220.
3. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:399–415.
4. Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22, 391–397.
5. Caplan LR. Diagnosis and Treatment of Ischemic Stroke. *JAMA* 1991;266:2413-2418.
6. Adams HP Jr, del Zoppo G, Alberts MJ i sur. Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: The American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Circulation* 2007;115:e478-534.
7. del Zoppo GJ, Saver JL, Jauch EC, Adams HP Jr; American Heart Association Council. Expansion of the time window for treatment of acute ischemic stroke with intravenous tissue plasminogen activator: a science advisory from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2009;40:2945-2948.
8. Fonarow GC, Smith EE, Saver JL, Reeves MJ, Bhatt DL, Grau-Sepulveda MV, Olson DM, Hernandez AF, Peterson ED, Schwamm LH. Timeliness of tissue-type plasminogen activator therapy in acute ischemic stroke: patient characteristics, hospital factors, and outcomes associated with door-to-needle times within 60 minutes. *Circulation* 2011;123:750-8.
9. Hachinski V, Donnan GA, Gorelick PB i sur. Stroke: working toward a prioritized world agenda. *Int J Stroke* 2010;5:238-56.

10. Gursoy-Ozdemir Y, Yemisci M, Dalkara T. Microvascular protection is essential for successful neuroprotection in stroke. *J Neurochem* 2012;123(S2):2-11.
11. Magisretti PJ, Pellerin L, Martin JL. Brain energy metabolism. ur. Bloom FE, Kupfer DJ. *Psychopharmacology – 4<sup>th</sup> generation of progress. An integrated perspective.* Raven Press, New York, 1995.
12. Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* 1997;17:251-7.
13. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 2010;67:181-198.
14. Katsura K, Kristian T, Siesjö BK. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* 1994;22:991-6.
15. Park CK, Nehls DG, Teasdale GM, McCulloch J. Effect of the NMDA antagonist MK-801 on local cerebral blood flow in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:617-22.
16. Furukawa K, Fu W, Li Y, Witke W, Kwiatkowski DJ, Mattson MP. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *J Neurosci* 1997;17:8178-86.
17. Chen ZL, Strickland, S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 1997;91:917-25.
18. Muralikrishna Adibhatla R, Hatcher JF. Phospholipase A<sub>2</sub>, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 2006;40:376-87.
19. Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 1997;20:132-9.
20. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271:C1424-37.
21. Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 1994;265:1883-5.
22. Dugan LL, Choi DW. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. *Ann Neurol* 1994;35:S17-S21.
23. Kristián T, Siesjö BK. Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 1998;29:705-18.



24. Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Murakami K, Kawase M, Chan PH. Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:1239-47.
25. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 1994;36:557-65.
26. Siesjo BK, Kristian T, Katsura K. *Cerebrovascular Disease*, ur. Ginsberg MD, Bogousslavsky J, Blackwell Science, 1998., str. 1-13.
27. Ginsberg MD. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Tomas Willis Lecture 2003;34:214-223.
28. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 1981;12(6):723-5.
29. Dereski MO, Chopp M, Knight RA, Rodolosi LC, Garcia JH. The heterogeneous temporal evolution of focal ischemic neuronal damage in the rat. *Acta Neuropathol* 1993;85:327-33.
30. Dohmen C, Sakowitz OW, Fabricius M, Bosche B, Reithmeier T, Ernestus RI, Brinker G, Dreier JP, Woitzik J, Strong AJ, Graf R; Co-Operative Study of Brain Injury Depolarisations (COSBID). Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Ann Neurol* 2008;63:720-8.
31. Leist M, Nicotera P. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res* 1998;239:183-201.
32. Du C, Hu R, Csernansky CA, Hsu CY, Choi DW. Very Delayed Infarction After Mild Focal Cerebral Ischemia: A Role for Apoptosis?. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:195-201.
33. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-12.
34. Fink K, Zhu J, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Endres M, Ma J, Dalkara T, Yuan J, Moskowitz MA. Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18(10):1071-6.
35. Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A, Demaro JA, Gidday JM, Shah A, Sun Y, Jacquin MF, Johnson EM, Holtzman DM. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Clin Invest* 1998;101:1992-9.

36. Yakovlev AG, Knoblach SM, Fan L, Fox GB, Goodnight R, Faden AI. Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J Neurosci* 1997;17:7415-24.
37. Schaller B, Graf R. Cerebral ischemia and reperfusion: The pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:351-371.
38. Johansson A, Ahrén B, Näsman B, Carlström K, Olsson T. Cortisol axis abnormalities early after stroke - relationships to cytokines and leptin. *J Intern Med* 2000;247:179-187.
39. Liebeskind DS. Reperfusion for acute ischemic stroke: arterial revascularization and collateral therapeutics. *Curr Opin Neurol* 2010;23:36-45.
40. Kunz A, Iadecola C. Cerebral vascular dysregulation in the ischemic brain. *Handbook of Clinical Neurology* 2008;92:283-305.
41. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 2003;26:248-254.
42. Paschen W. Shutdown of translation: lethal or protective? Unfolded protein response versus apoptosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23:773-779.
43. Hardingham GE, Lipton SA. Regulation of neuronal oxidative and nitrosative stress by endogenous protective pathways and disease processes. *Antioxid Redox Signal* 2011;14:1421-1424.
44. Yenari MA. Heat shock proteins and neuroprotection. *Adv Exp Med Biol* 2002;513:281-299.
45. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 2011;17:796-808.
46. Greenberg DA, Jin K. Growth factors and stroke. *NeuroRx* 2006;3:458-465.
47. Torres-Aleman I. Toward a comprehensive neurobiology of IGF-I. *Dev Neurobiol* 2010;70:384-396.
48. Digicaylioglu M. Erythropoietin in stroke: quo vadis. *Expert Opin Biol* 2010;10:937-949.
49. Kitagawa K. CREB and cAMP response element-mediated gene expression in the ischemic brain. *FEBS J* 2007;274:3210-3217.
50. Clarkson AN, Huang BS, Macisaac SE, Mody I, Carmichael ST. Reducing excessive GABA-mediated tonic inhibition promotes functional recovery after

- stroke. *Nature* 2010;468:305–309.
51. Kernie SG, Parent JM. Forebrain neurogenesis after focal ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 2010;37:267–274.
  52. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res* 2002;90:284–288.
  53. Iadecola C, Anrather J: Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions. *Nat Neurosci* 2011;14:1363-1368.
  54. Jin R, Yang Y, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol* 2010;87:779-89.
  55. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 2010;330(6005):841-5.
  56. Kim SU, de Vellis J. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 2005;81:302-313.
  57. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 2007;11:1387-1394.
  58. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science* 2005;308:1314-1318.
  59. Davalos D et al.. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nat Neurosci* 2005;8:752-758.
  60. Haynes et al.. The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci* 2006;9:1512-1519.
  61. Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 1999;30:77–105.
  62. Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* 2002;3:216–27.
  63. Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease—a double-edged sword. *Neuron* 2002;35:419–32.
  64. Nedergaard M, Dirnagl U. Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia*

- 2005;50:281-6.
65. Lalancette-Hebert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J: Selective ablation proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci* 2007;27:2596-2605.
  66. Lai AY, Todd KG. Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury. *Glia* 2008;56:259–70.
  67. Farber K i Kettenmann H. Purinergic signaling and microglia. *Pflugers Arch* 2006;452:615-621.
  68. Pocock JM i Kettemann H. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci* 2007;30:527-35.
  69. Konsman JP, Drukarch B, Van Dam AM. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin Sci (Lond)* 2007;112(1):1-25.
  70. Felger JC, Abe T, Kaunzner UW, Gottfried-Blackmore A, Gal-Toth J, McEwen BS, Iadecola C, Bulloch K. Brain dendritic cells in ischemic stroke: time course, activation state, and origin. *Brain Behav Immun* 2010;24:724-37.
  71. Lindsberg PJ, Strbian D, Karjalainen-Lindsberg ML. Mast cells as early responders in the regulation of acute blood-brain barrier changes after cerebral ischemia and hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010;30:689-702.
  72. Strbian D, Karjalainen-Lindsberg ML, Tatlisumak T, Lindsberg PJ. Cerebral mast cells regulate early ischemic brain swelling and neutrophil accumulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:605-612.
  73. Rao KN, Brown MA. Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Ann NY Acad Sci* 2008;1143:83-104.
  74. Kriz J. Inflammation in ischemic brain injury: timing is important. *Crit Rev Neurobiol* 2006;18:145-157.
  75. Amantea D, Nappi G, Bernardi G, Bagetta G, Corasantini MT. Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FASEB J* 2009;276:13-26.
  76. Jordan J, Segura T, Brea D, Galindo MF, Castillo J. Inflammation as therapeutic objective in stroke. *Curr Pharm Des* 2008;14:3549-64.
  77. Yilmaz G, Granger DN. Cell adhesion molecules and ischemic stroke. *Neurol Res* 2008;30:783-93.

78. Yilmaz G, Granger DN. Leukocyte recruitment and ischemic brain injury. *Neuromolecular Med* 2010;12:193-204.
79. Clark, RK, Lee, EV, White, RF, i sur. Reperfusion following focal stroke hastens inflammation and resolution of ischemic injured tissue. *Brain Research Bulletin* 1994;35:387–392.
80. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010;33:657-670.
81. Wang X, Yue TL, Barone FC, Feuerstein GZ. Monocyte chemoattractant protein-1 messenger RNA expression in rat ischemic cortex. *Stroke* 1995;26:661–666.
82. Chen Y, Hallenbeck JM, Ruetzler C, Bol D, Thomas K, Berman NEJ, Vogel SN. Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23:748–755.
83. Schilling M, Strecker JK, Schabitz WR, Ringelstein EB, Kiefer R. Effects of Monocyte Chemoattractant Protein 1 on blood-borne cell recruitment after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience* 2009;161:806–812.
84. Schilling M, Besselmann M, Muller M, Strecker JK, Ringelstein, EB, Kiefer R. Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* 2005;196:290-297.
85. Breckwoldt MO, Chen JW, Stangenberg L, Aikawa E, Rodriguez E, Qiu S, Moskowitz MA, Weissleder R. Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme myeloperoxidase *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:18584-18589.
86. Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, Kiefer R. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* 2003;183:25-33.
87. Tanaka R, Komine-Kobayashi M, Mochizuki H, Yamada M, Furuya T, Migita M, Shimada T, Mizuno Y, Urabe T. Migration of enhanced green fluorescent protein expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mouse brain following permanent focal ischemia. *Neuroscience* 2003;117:531-539.
88. Campanella M, Sciorati C, Tarozzo G, Beltramo M: Flow Cytometric Analysis of

- Inflammatory Cells in Ischemic Rat Brain. *Stroke* 2002;33:586-592.
89. Lalancette -Hébert M, Swarup V, Beaulieu M, Bohacek I, Abdelhamid E, Weng Y-C, Sato S, Kriz J: Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury. *J Neurosci* 2012;25;32:10383-95.
  90. Meszaros AJ, Reichner JS, Albina JE. Macrophage-induced neutrophil apoptosis. *J Immunol* 2000;165:435-441.
  91. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* 1997;61:375-380.
  92. Neumann J, Sauerzweig S, Rönicke R, Gunzer F, Dinkel K, Ullrich O, Gunzer M, Reymann KG. Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. *J Neurosci* 2008;28,5965-5975.
  93. Shichita T, Ago T, Kamouchi M, Kitazono T, Yoshimura A, Ooboshi H. Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke. *J Neurochem* 2012;123Supl.2:29-38.
  94. Gelderblom M, Leypoldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, Arumugam TV, Orthey E, Gerloff C, Tolosa E, Magnus T. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* 2009;40:1849-57.
  95. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Saunders Elsevier; 2007, 6. izdanje, str. 49-56.
  96. Wan YY. Multitasking of helper T cells. *Immunology* 2010;130:166-171.
  97. Bornstein NM, Aronovich B, Korczyn AD, Shavit S, Michaelson DM, Chapman J. Antibodies to brain antigens following stroke. *Neurology* 2001;56:529-30.
  98. Yilmaz G, Arumugam TV, Stokes KY, Granger DN. Role of T lymphocytes and interferon- $\gamma$  in ischemic stroke. *Circulation* 2006;113:2105-2112.
  99. Simard M, Arcuino G, Takano T, Liu QS, Nedergaard M. Signaling at the gliovascular interface. *J Neurosci* 2003;23:9254-9262.
  100. Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 2003;26:523-530.
  101. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 2005;50:427-434.
  102. Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 2002;22:183-192.

103. Bushong EA, Martone ME, Ellisman MH. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci* 2004;22:73–86.
104. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostefeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 1999;23:297–308.
105. Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 2004;24:2143–2155.
106. Askalan R, Deveber G, Ho M, Ma J, Hawkins C. Astrocytic-inducible nitric oxide synthase in the ischemic developing human brain. *Pediatr Res* 2006, 60:687–692.
107. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:146-156.
108. Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* 2005;11:400–407.
109. Bao Y, Qin L, Bhosle S, Guo H, Febbraio M, Haskew-Layton RE, Ratan R, Cho S. CD36 is involved in astrocyte activation and glial scar formation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012;32:1567-1577.
110. Beurel E, Michalek SM, Jope RS. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends Immunol* 2010;31:24–31.
111. Hanisch UK, Johnson TV, Kipnis J. Toll-like receptors: roles in neuroprotection? *Trends Neurosci* 2008;31:176–182.
112. Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* 2006;7:1250–1257.
113. Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009;227:221–233.
114. Sansonetti PJ. The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. *Nat Immunol* 2006;7:1237–1242.
115. Willingham SB, Ting JP. NLRs and the dangers of pollution and aging. *Nat Immunol* 2008;9: 831–833.
116. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007;81:1–5.

117. Matzinger P. Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat Immunol* 2007;8:11–13.
118. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008;8:279–289.
119. Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 1985;42:779–789.
120. Hansson GK, Edfeldt K. Toll to be paid at the gateway to the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1085–1087.
121. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973–983.
122. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Riccardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in the *Tlr4* gene. *Science* 1998;282:2085–2088.
123. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394–397.
124. Leulier F, Lemaitre B. Toll-like receptors: taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet* 2008;9:165–178.
125. Okun E, Griffioen KJ, Lathia JD, Tang SC, Mattson MP, Arumugam TV. Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain Res Rev* 2009;59:278–292.
126. Marsh BJ, Williams-Karnesky RL, Stenzel-Poore MP. Toll-like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke. *Neuroscience* 2009;158:1007–1020.
127. Wang YC, Lin S, Yang QW. Toll-like receptors in cerebral ischemic inflammatory injury. *J Neuroinflammation* 2011;8:134.
128. Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 2004;76:514–9.
129. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499–511.
130. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2010;10:89–102.



131. Marsh BJ, Stenzel-Poore MP. Toll-like receptors: novel pharmacological targets for the treatment of neurological diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8:8-13.
132. Karikó K, Weissman D, Welsh FA. Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling-a unifying theme in ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:1288–304.
133. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Diff* 2006;13:816-825.
134. Saraiva M i O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010;10:170-181.
135. Rolls A, Shechter R, London A, Ziv Y, Ronen A, Levy R, Schwartz M. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol* 2007;9:1081-8.
136. Hanke M, Kielian T., Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutical potential. *Clin Sci* 2011;121:367-87.
137. Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott, I. Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia* 2003;43:281-291.
138. Esen N, Tanga FY, DeLeo JA, Kielian T. Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates astrocyte activation in response to the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*. *J Neuroch* 2004;88:746-758.
139. Bsibsi M, Persoon-Deen C, Verwer RW, Meeuwssen S, Ravid R and Van Noort JM. Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators. *Glia* 2006;53:688-695.
140. Kigerl KA, Lai W, Rivest S, Hart RP, Satoskar AR, Popovich PG, Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 regulate inflammation, gliosis and myelin sparing after spinal cord injury. *Neurochemistry* 2007;102:37-50.
141. Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, Lathia JD, Siler DA, Chigurupati S, Ouyang X, Magnus T, Camandola S, Mattson MP. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13798-803.
142. Doan T, Melvold R, Viselli S, Waltenbaugh C. *Immunology*. Lippincott Illustrated Reviews: Immunology. Lippincott, Williams&Wilkins, Wolters Kluwer Health; 2008, str. 17.
143. Babcock AA, Wirenfeldt M, Holm T, Nielsen HH, Dissing-Olesen L, Toft-Hansen H, Millward JM, Landmann R, Rivest S, Finsen B, Owens T. Toll-like receptor 2 signaling in response to brain injury: an innate bridge to neuroinflammation. *J*

- Neurosci 2006;26:12826–12837.
144. Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I. Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* 2007;115:1599–1608.
  145. Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci* 2002;22:2478–2486.
  146. Nau R, Bruck W. Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci* 2002;25:38–45.
  147. Nguyen MD, D'Aigle T, Gowing G, Julien JP, Rivest S. Exacerbation of motor neuron disease by chronic stimulation of innate immunity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 2004;24:1340–1349.
  148. Casula M, Iyer AM, Spliet WG, Anink JJ, Steentjes K, Sta M, Troost D, Aronica E. Toll-like receptor signaling in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Neuroscience* 2011;179:233-43.
  149. Aravalli RN, Peterson PK, Lokensgard JR. Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 2007;2:297–312.
  150. Bianchi ME, Manfredi AA. Dangers in and out. *Science* 2009;323:1683-1684.
  151. Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 2004,173:3916-24.
  152. Lehnardt S, Lehrmann S, Kaul D, Tschimmel K, Hoffmann O, Cho S, Krueger C, Nitsch R, Meisel A, Weber JR: Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia. *J Neuroim* 2007;190:28-33.
  153. Ziegler G, Harhausen D, Schepers C, Hoffmann O, Röhr C, Prinz V, König J, Lehrach H, Nietfeld W, Trendelenburg G: TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;359:574-579.
  154. Hua F, Ma J, Ha T, Kelley JL, Kao RL, Schweitzer JB, Kalbfleisch JH, Williams DL, Li C. Differential roles of TLR2 and TLR4 in acute focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Brain Research* 2009;1262:100–108.
  155. Cao CX, Yang QW, Lv FL, Cui J, Fu HB, Wang JZ. Reduced cerebral ischemia-

- reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice. *Biochem Biophys Res Comm* 2007;353:509-514.
156. Cordeau P, Kriz J. Real-time imaging after cerebral ischemia: model systems for visualization of inflammation and neuronal repair. *Methods Enzymol* 2012;506:117-33.
  157. Close, D. M., Hahn, R. E., Patterson, S. S., Baek, S. J., Ripp, S. A., and Sayler, G. S. Comparison of human optimized bacterial luciferase, firefly luciferase, and green fluorescent protein for continuous imaging of cell culture and animal models. *J Biomed Opt* 2011;16:047003.
  158. Contag, C. H., and Bachmann, M. H. Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. *Annu Rev Biomed Eng* 2002;4:235–260.
  159. Luker, K. E., and Luker, G. D. Bioluminescence imaging of reporter mice for studies of infection and inflammation. *Antiviral Res* 2010;86:93–100.
  160. Cordeau, P., Jr., Lalancette-Hebert, M., Weng, Y. C., and Kriz, J. Live imaging of neuroinflammation reveals sex and estrogen effects on astrocyte response to ischemic injury. *Stroke* 2008;39:935–942.
  161. Gravel M, Weng Y-C, Kriz J. Model System for Live Imaging of Neuronal Responses to Injury and Repair. *Mol Imaging* 2011;10:434-45.
  162. Lalancette-Hebert M, Phaneuf D, Soucy G, Weng YC, Kriz J: Live imaging of Tolllike receptor 2 response in cerebral ischaemia reveals a role of olfactory bulb microglia as modulators of inflammation. *Brain* 2009;132:940-954.
  163. Lalancette-Hebert, M., Moquin, A., Choi, A. O., Kriz, J., and Maysinger, D. Lipopolysaccharide-QD micelles induce marked induction of TLR2 and lipid droplet accumulation in olfactory bulb microglia. *Mol. Pharm* 2010;7:1183–1194.
  164. Maysinger, D., Behrendt, M., Lalancette-Hebert, M., and Kriz, J. Real-time imaging of astrocyte response to quantum dots: In vivo screening model system for biocompatibility of nanoparticles. *Nano Lett* 2007;7:2513–2520.
  165. Keller, A. F., Gravel, M., and Kriz, J. Live imaging of amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: Disease onset is characterized by marked induction of GFAP in Schwann cells. *Glia* 2009;57:1130–1142.
  166. Keller, A. F., Gravel, M., and Kriz, J. Treatment with minocycline after disease onset alters astrocyte reactivity and increases microgliosis in SOD1 mutant mice. *Exp. Neurol* 2011;228:69–79.

167. Swarup, V., Phaneuf, D., Bareil, C., Robertson, J., Kriz, J., and Julien, J. P. Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with genomic fragments encoding wild-type or mutant forms of human transactive response DNA-binding protein 43. *Brain* 2011;134:2610–2626.
168. Lalancette-Hebert M, Julien C, Cordeau P, Bohacek I, Weng YC, Calon F, Kriz J. Accumulation of dietary docosahexaenoic acid in the brain attenuates acute immune response and development of postischemic neuronal damage. *Stroke* 2011;42:2903-2909.
169. Belayev L, Busto R, Zhao W, Fernandez G, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation. *Brain Res* 1999;833:181-190.
170. Beaulieu JM, Kriz J, Julien JP. Induction of peripherin expression in subsets of brain neurons after lesion injury or cerebral ischemia. *Brain Res* 2002;946:153-61.
171. Miyazawa T, Tamura A, Fukui S, Hossmann K-A. Effect of mild hypothermia on focal cerebral ischemia. Review of experimental studies. *Neurol Res* 2003;25:457–64.
172. Ziegler G, Freyer D, Harhausen D, Khojasteh U, Nietfeld W, Trendelenburg G: Blocking TLR2 in vivo protects against accumulation of inflammatory cells and neuronal injury in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010;31:757-66.
173. Laflamme N, Rivest S. Effects of systemic immunogenic insults and circulating proinflammatory cytokines on the transcription of the inhibitory factor kappaB alpha within specific cellular populations of the rat brain. *J Neurochem* 1999;73:309-321.
174. RayBio Mouse Cytokine Array User Manual, Revised June 14, 2009, preuzeto s: <http://raybiotech.com/manual/Antibody%20Array/AAM-CYT.pdf>
175. Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1995;26:627–635.
176. Hill JK, Gunion-Rinker L, Kulhanek D, Lessov N, Kim S, Clark WM, Dixon MP, Nishi R, Stenzel-Poore MP, Eckenstein FP: Temporal modulation of cytokine expression following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 1999;820:45-54.
177. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant

- Protein-1: An Overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009;29:313-326.
178. Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B: Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;48:196-206.
179. Sato S, Ouellet N, Pelletier I, Simard M, Rancourt A, Bergeron MG. Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. *J Immunol* 2002;168:1813–1822.
180. Sato S, Nieminen J. Seeing strangers or announcing “danger”: galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconj J* 2004;19:583–591.
181. Nieminen J, St-Pierre C, Sato S. Galectin-3 interacts with naive and primed neutrophils, inducing innate immune responses. *J Leukoc Biol* 2005;78:1127–1135.
182. Rotshenker S. The role of Galectin-3/MAC-2 in the activation of the innate-immune function of phagocytosis in microglia in injury and disease. *J Mol Neurosci* 2009;39:99–103.
183. Nakajima K, Kohsaka S: Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2004;4:65-84.
184. O'Donnell SL, Frederick TJ, Krady JK, Vannucci SJ, Wood TL: IGF-I and microglia/macrophage proliferation in the ischemic mouse brain. *Glia* 2002;39:85-97.
185. Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, Pardo AC, Nodin C, Ståhlberg A, Aprico K, Larsson K, Yabe T, Moons L, Fotheringham A, Davies I, Carmeliet P, Schwartz JP, Pekna M, Kubista M, Blomstrand F, Maragakis N, Nilsson M, Pekny M. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;28:468-81.
186. Shimamura N, Matchett G, Tsubokawa T, Ohkuma H, Zhang J. Comparison of silicon-coated nylon suture to plain nylon suture in the rat middle cerebral artery occlusion model. *J Neurosci Methods* 2006;30;156:161–165.
187. Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E, Shapiro A, Antel JP. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* 2005;175:4320-4330.
188. Arumugam TV, Okun E, Tang SC, Thundyil J, Taylor SM, Woodruff TM. Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury. *Shock* 2009;32:4-16.

189. Kielian T. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res* 2006;883:711-730.
190. Hoffmann O, Braun JS, Becker D, Halle A, Freyer D, Dagand E, Lehnardt S, Weber JR. TLR2 mediates neuroinflammation and neuronal damage. *J Immunol* 2007;178:6476-6481.
191. Debierre-Grockenigo F, Niehus S, Coddeville B, Ellass E, Poirier F, Weingart R, Schmidt RR, Mazurier J, Guerardel Y, Schwartz RT. Binding of *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols to galectin-3 is required for their recognition by macrophages. *J Biol Chem* 2010;285:32744-32750.
192. Stoll G, Jander S, Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* 1998;56:149-171.
193. Hailer NP, Grampp A, Nitsch R. Proliferation of microglia and astrocytes in the dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: a quantitative bromodeoxyuridine labelling study. *Eur J Neurosci* 1999;11:3359-3364.
194. Bechmann I, Goldmann J, Kovac AD, Kwidzinski E, Simburger E, Naftolin F, Dirnagl U, Nitsch R, Priller J. Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB J* 2005;15:1086-1088.
195. Wirenfeldt M, Babcock AA, Ladeby R, Lambersten KL, Dagnaes-Hansen F, Leslie RG, Owens T, Finsen B. Reactive microgliosis engages distinct responses by microglial subpopulations after minor central nervous system injury. *J Neurosci Res* 2005;82: 507-514.
196. Poon IK, Hulett MD, Parish CR. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Differ* 2010;17:381-397.
197. Guan J, Williams C, Gunning M, Mallard C, Gluckman P. The effects of IGF-1 treatment after hypoxic-ischemic brain injury in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993;13:609-616.
198. Beilharz EJ, Russo VC, Butler G, Baker NL, Connor B, Sirimanne ES, Dragunow M, Werther GA, Gluckman PD, Williams CE, Scheepens A. Co-ordinated and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic-ischemic injury. *Brain Res Mol Brain Res* 1998;59:119-134.
199. Gesuete R, Storini C, Fantin A, Stravalaci M, Zanier ER, Orsini F, Vietsch H, Mannesse ML, Ziere B, Gobbi M, De Simoni MG. Recombinant C1 inhibitor in

- brain ischemic injury. *Ann Neurol* 2009;66:332-42.
200. Iadecola C, Zhang F, Xu X. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol* 1995;268:R286-92.
  201. Lee ST, Chu K, Jung KH, Kim SJ, Kim DH, Kang KM, Hong NH, Kim JH, Ban JJ, Park HK, Kim SU, Park CG, Lee SK, Kim M, Roh JK. Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke. *Brain* 2008;131:616-29.
  202. Prestigiacomo CJ, Kim SC, Connolly ES Jr, Liao H, Yan SF, Pinsky DJ. CD18-mediated neutrophil recruitment contributes to the pathogenesis of reperfused but not nonreperfused stroke. *Stroke* 1999;30:1110-7.
  203. Stowe AM, Adair-Kirk TL, Gonzales ER, Perez RS, Shah AR, Park TS, Gidday JM. Neutrophil elastase and neurovascular injury following focal stroke and reperfusion. *Neurobiol Dis* 2009;35:82-90.
  204. Subramanian S, Zhang B, Kosaka Y, Burrows GG, Grafe MR, Vandenberg AA, Hurn PD, Offner H. Recombinant T cell receptor ligand treats experimental stroke. *Stroke* 2009;40:2539-45.
  205. Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, Doerr H, Sommer C, Rivest S, Giese T, Veltkamp R. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med* 2009;15:192-9.
  206. Fagan S, Cronin LE, Hess DC. Minocycline development for acute ischemic stroke. *Transl Stroke Res* 2011;2:202-208.
  207. Hayakawa K, Mishima K, Nozako M, Hazekawa M, Mishima S, Fujioka M, Orito K, Iwasaki K, Fujiwara M. Delayed treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. *Stroke* 2008;39:951-958.
  208. Kikuchi K, Uchikado H, Morioka M, Murai Y, Tanaka E. Clinical neuroprotective drugs for treatment and prevention of stroke. *Int J Mol Sci* 2012;13:7739-7761.
  209. Bath PM, Sprigg N. Colony stimulating factors (including erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor and analogues) for stroke. *Cochrane Database of Systematic Reviews* CD005207, online izdanje, 2007, doi:10.1002/14651858.CD005207.pub3.
  210. Tang XN, Yenari MA. Hypothermia as a cytoprotective strategy in ischemic tissue injury. *Ageing Res Rev* 2010;9:61-68.

211. Hemmen TM, Raman R, Guluma KZ, Meyer BC, Gomes JA, Cruz-Flores S, Wijman CA, Rapp KS, Grotta JC, Lyden PD; ICTuS-L Investigators. Intravenous thrombolysis plus hypothermia for acute treatment of ischemic stroke (ICTuS-L): final results. *Stroke* 2010;41:2265-70.
212. Ren C, Gao M, Dornbos D 3<sup>rd</sup>, Ding Y, Zeng X, Luo Y, Ji X. Remote ischemic post-conditioning reduced brain damage in experimental ischemia/reperfusion injury. *Neurol Res* 2011;33:514-9.
213. Zhao H, Chuancheng R, Chen X, Shen J. From Rapid to Delayed and Remote Postconditioning: the Evolving Concept of Ischemic Postconditioning in Brain Ischemia. *Curr Drug Targets* 2012;13:173-187.
214. Beamer NB, Coull BM, Clark WM, Hazel JS, Silberger JR. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke. *Ann Neurol* 1995;37:800–805.
215. Vila N, Reverter JC, Yague J, Chamorro A. Interaction between interleukin-6 and the natural anticoagulant system in acute stroke. *J Interferon Cytokine Res* 2000;20:325–329.
216. Barone FC, Arvin B, White RF et al. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 1997;28:1233–1244.
217. Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H et al. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke* 1995;26:676–680.
218. Loddick SA, Rothwell NJ. Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:932-940.
219. Relton JK, Martin D, Thompson RC, Russell DA. Peripheral administration of interleukin-1 receptor antagonist inhibits brain damage after focal cerebral ischemia in the rat. *Exp Neurol* 1996;138:206–213.
220. Weng YC, Kriz J (2007) Differential neuroprotective effects of a minocycline-based drug cocktail in transient and permanent focal cerebral ischemia. *Exp Neurol* 2007;204:433-42.
221. Sugimoto K, Iadecola C. Delayed effect of administration of COX-2 inhibitor in mice with acute cerebral ischemia. *Brain Res* 2003;960:273–276.
222. Clark WM, Rinker LG, Lessov NS et al. Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia. *Stroke* 2000;31:1715–1720.



223. Bruce AJ, Boling W, Kindy MS et al. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 1996;2:788–794.
224. Fontaine V, Mohand-Said S, Hanoteau N et al. Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J Neurosci* 2002;22:RC216.
225. Scherbel U, Raghupathi R, Nakamura M et al. Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8721–8726.
226. Stahel PF, Shohami E, Younis FM et al. Experimental closed head injury: analysis of neurological outcome, blood–brain barrier dysfunction, intracranial neutrophil infiltration, and neuronal cell death in mice deficient in genes for pro-inflammatory cytokines. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:369–380.
227. Hallenbeck JM. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med* 2002;8:1363-1368.
228. Kriz J, Lalancette-Hebert M. Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* 2009;117:497-509.

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođen sam 30. rujna 1983. godine u Vinkovcima. Osnovnu školu i opću (7.) gimanziju završio sam u Zagrebu. Studij medicine upisao sam 2001. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje sam i diplomirao 2008. godine. U studenom iste godine zaposlen sam kao znanstveni novak-asistent na projektu pod nazivom "Uloga gena u diferencijaciji i plastičnosti središnjeg živčanog sustava miša", voditelja prof. dr. sc. Srećka Gajovića, sa radnim mjestom na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od studenog 2008. godine obavio sam jednogodišnji pripravnički staž u statusu volontera na Kliničkom bolničkom centru Zagreb, a 2010. godine sam položio stručni ispit. Također, 2008. godine upisao sam poslijediplomski doktorski studij iz Neuroznanosti na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu kojega sam prijavio doktorsku disertaciju. Osim na navedenom projektu, sudjelovao sam i na projektu pod nazivom "Regeneracija i plastičnost nakon ishemijskoga oštećenja mozga proučavane na inovativnim transgeničnim mišjim modelima", financiranog iz fonda "Jedinstvo uz pomoć znanja" (engl. *UKF – Unity through Knowledge Fund*). U sklopu navedenog projekta boravio sam četiri puta u suradnom laboratoriju Zavoda za psihijatriju i neuroznanost Medicinskog fakulteta Sveučilišta Laval, Quebec City, Kanada, pod vodstvom prof. dr. sc. Jasne Križ, koja je također suvoditelj izložene doktorske disertacije. Tijekom trajanja dokorskog studija dobio sam Pohvalnicu i nagradu za iznimnu znanstvenu produktivnost 2011. godine. Autor sam 3 CC indeksirana znanstvena rada, te 9 sažetaka na međunarodnim kongresima. Uz navedeno, sudjelujem u nastavi predmeta "Histologija i embriologija" za studente Medicinskog fakulteta u Zagrebu, te u nastavi istog predmeta na Studiju medicine na engleskome jeziku. Od 2011. godine izvršni sam urednik u časopisu "Croatian Medical Journal". Redovni sam član Hrvatskog društva za neuroznanost, Hrvatskog mikroskopijskog društva, Hrvatskog katoličkog liječničkog društva, te Hrvatskog liječničkog zbora.