

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

Gorup, Dunja

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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

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

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-15**



Repository / Repozitorij:

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



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Dunja Gorup

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

DISERTACIJA



Zagreb, 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Dunja Gorup

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

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

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

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

Voditelj rada: prof. dr. sc. Šrećko Gajović

Suvoditeljica rada: prof. dr. sc. Jasna Krifl

Zahvaljujem svojim voditeljima,

*prof. dr. sc. Jasni Križ i prof. dr. sc. Srećku Gajoviću
na izlasku ususret, potpori i pomoći tijekom izrade ovog doktorata,
ali i oblikovanju i usmjeravanju mog pristupa znanosti.*

*Svojim su primjerom strpljivo i mudro ukazali
na temeljne odrednice kvalitetnog istraživanja,
te je sama izrada doktorata u njihovim laboratorijima bila privilegija koja
poziva da se mladi znanstvenik na njih ugleda i u svom dalnjem radu.*

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

*Hvala kolegici Ladi Brkić Ahmed na motivaciji i lektorirnju radnih verzija
disertacije te svim suradnicima na njihovoј bezrezervnoј pomoći i
profesionalnosti.*

Zahvaljujem svojoj obitelji na podršci i razumijevanju.

SADRŽAJ

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

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

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

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

10.	POPIS LITERATURE	136
11.	ŽIVOTOPIS	144

POPIS OZNAKA I KRATICA

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

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

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

1. UVOD I SVRHA RADA

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

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

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

1.1. Istraživanje moždanog udara kao javnozdravstveni prioritet

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

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

(dijagnosti ka skupina I60-69 prema 10. Meunarodnoj klasifikaciji bolesti: 7.300), slijede rak bronha i plu a (2.827) te zlo udna novotvorina debelog crijeva (2.094) (8).

Pri tom mofldani udar ini veliku ve inu unutar dijagnostike skupine I60-69, u koju spadaju jo- i subarahnoidno, subduralno i epiduralno krvarenje, okluzije, stenoze i ostali rje i poreme aji krvnih flila mozga (3).

Smrtnost od kardiovaskularnih bolesti, pod koje se mofldani udar registrira, u Europskoj uniji opada, no kako o ekivano trajanje flivota raste i produljuje se o ekivano preflivljenje osoba s bolestima srca i krvnih flila, raste broj mu-karaca i flena koje flive s navedenim bolestima. Naime, smrtnost nakon prvog nastupa mofldanog udara iznosi oko 30% unutar prvih mjesec dana, dok kod 30% preflivjelih nakon 6 mjeseci postoji trajno te-ko neurolo-ko o-te enje (9).

Prema podacima iz 2007. godine, cerebrovaskularne bolesti nalazile su se me u naj e- im uzrokom bolni kog lije enja u Hrvatskoj s ukupnim brojem od 18.893 hospitalizacija (420/100.000), a me u njima je kao naj e- a pojedina na dijagnoza bio mofldani udar s 50,3% (10). Prema procjeni WHO-a iz 2003. godine, prosje ni tro-kovi njege po bolesniku 6 mjeseci nakon mofldanog udara iznosili su 16.000 EUR na temelju ega je mofldani udar zauzeo 2. mjesto na popisu najskupljih bolesti starijih osoba (nakon demencije) te se smatra kako e se ti tro-kovi unutar 10 godina pove ati za 40% (11).

Socioekonomsko i javnozdravstveno optere enje mofldanim udarom razvidno je prikazano prilago enim godinama flivota s onesposobljeno- u (*engl. Disability adjusted life years*, DALYs), u iji izra un ulaze izgubljene godine flivota uslijed prijevremenog umiranja i godine flivota s onesposobljeno- u/disabilitetom. WHO procjenjuje kako Hrvatska godi-nje izgubi 989 godina na 100.000 stanovnika, tj. ukupno oko 50.000 godina, dok se na globalnoj razini predvi a kako e teret bolesti porasti s 38 milijuna DALY-a izra unatih 1990. na 61 milijun DALY-a 2020. godine.

Unato velikom javnozdrastvenom utjecaju, mofldanom se udaru u mnogim zemljama ne pridaje dovoljno zna enje (12). Iako se u razvijenim zemljama, kao -to su „stare“ lanice Europske unije, mortalitet od mofldanog udara posljednjih godina stabilizirao na oko 65/100.000 (u Hrvatskoj iznosi 112,3/100.000), zbog pove anja udjela stanovni-tva starije dobne skupine te dalnjim napretkom zemalja s niskom stopom razvoja, projekcije govore kako e incidencija mofldanog udara i ubudu e rasti (13, 14).

Zato se bez u inkovitije strategije prevencije, lije enja i rehabilitacije mofldanog udara i tro kovi lije enja ove bolesti mogu samo pove avati (15). Takvo zate eno neuroepidemiolo ko stanje, uz prognoze zdravstvenih stru njaka, zahtijeva ulaganja u nova znanstvena istraflivanja, uklju uju i ona na bazi noj razini, koja e se svojom translacijskom vrijedno u odraziti na kvalitetu flivota oboljelih.

1.2. Životinjski modeli ishemiskog moždanog udara

Izme u mofldanog udara svakog pojedinog oboljelog postoji velika varijabilnost u pogledu uzroka, trajanja, lokalizacije, teffline ishemije i prate ih sustavnih oboljenja.

To oteflava provo enje klini kog ispitivanja jer je za isklju ivanje imbenika posredne povezanosti potrebno okupiti vrlo velik broj ispitanika.

Suprotno tome, eksperimentalni modeli omogu uju potpunu kontrolu varijabli i istraflivanje specifi nih znanstvenih pitanja imbenika rizika, patofiziolo kih procesa te preventivno terapijskih postupaka prije i nakon o-te enja. Od modela se istovremeno o ekuje da -to vjernije opona-a ishemiske procese prisutne kod ovjeka.

1.2.1. Osnovne značajke životinjskih modela ishemiskog moždanog udara

Kako bi se ishemiski procesi prisutni kod ovjeka -to stvarnije modelirali, prilikom razvoja, odabira ili prilagodbe odre enog modela, potrebno je uzeti u obzir nekoliko zna ajki:

- I. zna enje patofiziolo kih zbivanja za mofldani udar kod ovjeka
- II. reproducibilnost
- III. jednostavnost i minimalna invazivnost
- IV. mogu nost nadziranja i odrflavanja fiziolo kih parametara
- V. dostupnost uzoraka za histopatolo ka, biokemijska i molekularna mjerena
- VI. ulofleni trud i tro kovi moraju biti unutar granica razumno izvedivog (16)

Prva to ka nagla ava kako je presudan odabir flivotinjske vrste koja bi omogu ila ekstrapolaciju rezultata istraflivanja na ljudi. Prema preporukama Okruglog stola znanstvenika i industrije za lije enje mofldanog udara (*engl. Stroke Treatment Academic Industry Round Table, STAIR*) ispitivanje lijekova valja zapo eti na malim flivotnjama, a u slu aju pozitivnog rezultata replicirati istraflivanje na vi im sisavcima, primatima (17).

Ispitivanja na manjim flivotinjama (glodavcima), imaju i ote prednosti u vidu manjih tro-kova uzgoja te bolje eti ke prihva enosti u odnosu na primate. U tom su se svjetlu glodavci, a osobito –takor i mi– kao vrste, pokazali idealni jer svojom anatomijom krvnih filia s o uvanim Willisovim krugom i fiziologijom nalikuju ovjeku (18).

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

Ontogenetska istraflivanja pokazuju kako je razvoj krvnih filia pratio razvoj encefalona kako bi zadovoljio njegove visoke potrebe za kisikom i glukozom te su, unato svim promjenama arterijskih grana, teritoriji pojedinih mofldanih krvnih filia ostali o uvani (19). Me utim, ostale flivotinske vrste pored glodavaca, poput zeca, sko imi-a, ma ke, psa i svinje pokazuju prisutnost uspostave kolateralne cirkulacije. Tako primjerice kod pasa *a.vertebralis* preuzima ulogu *a.carotis internae* te brojnim intra- i ekstrakranijalnim anastomozama –titi encefalon od ishemije (20). Takve se vrste, osobito mongolski sko imi-, mogu koristiti u modelima globalne ishemije koji opona–aju o-te enje mozga nastalo zaka–njelom ili slabo djelotvornom kardiorespiratornom resuscitacijom s nastupom hipoperfuzije, no nisu pogodne za modele fokalne ishemije (Tablica 1.) (21).

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

Globalna ishemija		Žarišna (fokalna) ishemija	
POTPUNA	NEPOTPUNA	UNIFOKALNA	MULTIFOKALNA
<ul style="list-style-type: none"> • dekaptacij • okluzija aorte/v.cave • vanjska poveska ili kompresija • sr ani zastoj 	<ul style="list-style-type: none"> • krvarenje ili hipotenzija • hipoksi na ishemija • intrakranijalna hipertenzija i okluzija zajedni ke karotide (CCA) • okluzija 2 file i hipotenzija • okluzija 4 file • unulateralna okluzija CCA 	<ul style="list-style-type: none"> • konstrikcija endotelinom-1 • <u>MCAO:</u> <ul style="list-style-type: none"> → <u>endovaskularna (reverzibilna)</u> → transkranijalna proksimalna(trajna) → transkranijalna distalna(trajna) • spontani mofldani udar • embolizacija makrosferama 	<ul style="list-style-type: none"> • embolizacija krvnim ugru–kom • embolizacija mikrosferama • fototromboza

1.2.3. Značajke MCAO modela ishemiskog oštećenja mozga

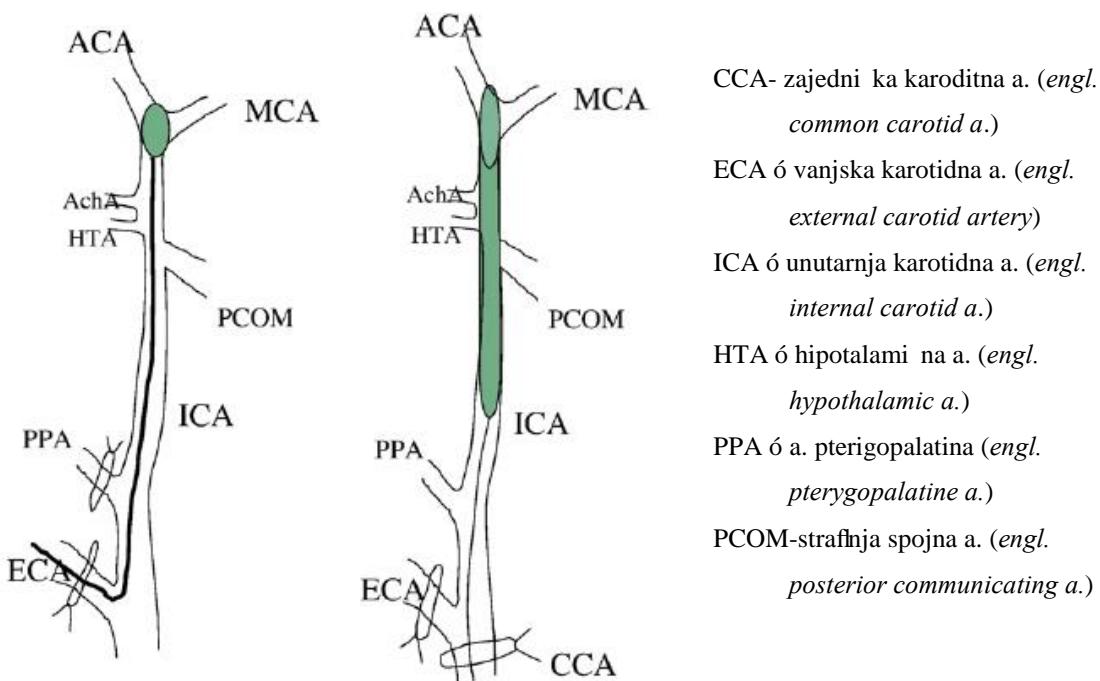
Budući da ishemski oblik moftanog udara inačica oko 80% svih moftanih udara te nastaje uslijed trombotskog ili embolijskog zatvaranja (okluzije) neke od velikih terminalnih krvnih filja mozga, najčešće srednje moftane arterije (*a. cerebri media*), flivotinjski modeli najčešće nastoje reproducirati ishemiju u teritoriju MCA (22).

No, i visoko sročni sojevi miševa poput C57Bl/6, koji su genetska osnova svih miševa korištenih u ovom doktoratu, pokazuju varijacije moftane cirkulacije s visokom učestalom u displazije straflnjih poveznih arterija (*lat. a. communicantes posteriores, engl. posterior communicating a.*, PcomA) što uzrokuje povećanu smrtnost i nestabilnost lezije kod primjene trajne okluzije MCA intraluminalnim filamentom. Navedeno je moguće izbjegi i ukoliko se za okluziju upotrebljava vrlo tanka silikonska presvlaka (veličina 8-0) (23).

Brojna postupna unapredjenja postupka ključna su za njegovo poboljšavanje (*engl. refinement*) u pogledu preflivljenja flivotinja, koje inačica jedno od 3R dobre laboratorijske prakse rada sa flivotinjama (zamjena, smanjenje, poboljšavanje, *engl. replacement, reduction, refinement, RRR*) (24). To je važno iz razloga što STAIR preporuka uvećava model trajne MCAO za provjerenje po etnih ispitivanja lijekova za primjenu u moftanom udaru, osim u slučaju evima kad se djelovanje lijeka očekuje nakon reperfuzije (17).

1.2.4. Inačice MCAO modela

Koizumi je 1986. godine prvi opisao izazivanje MCAO intraluminalnim filamentom kod -takora, a od tada je zahvat doffivo brojne preinake. Npr. model je prilagoen i za mi-eve, uvedene su nove duljine samog filimenta, kao i duljina i materijal kojim je presvu en (Slika 1.) (25, 26). Obzirom na mogunost ostavljanja trajne okluzije ili uspostave reperfuzije, ustanovljeno je da je vremensko razdoblje 3 sata ključno za irreverzibilna ishemiska o-te enja, dok je za izazivanje reproducibilnih o-te enja koja uključuju reperfuziju potrebno trajanje okluzije od 60-90 minuta (27). Inačice trajne okluzije MCA su i elektrokauterizacija njenog proksimalnog (28) i distalnog dijela (29) kroz kraniotomiju.



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

1.2.5. Čimbenici varijabilnosti MCAO modela

Cilj ishemiskog modela je posti i homogenu i reproducibilnu leziju s malom varijabilno- u kako bi se pove ala pouzdanost pokusa.

Reperfuzija s proizvoljno varijabilnim vremenom jedna je od prednosti MCAO modela intraluminalnim tj. endovaskularnim filamentom, -to preciznije imitira rekanalizaciju koja se zajedno s reperfuzijskom ozljedom naj e- e doga a kod ljudi (31). Preostale prednosti predstavljaju mala invazivnost (ne zahtjeva kraniotomiju kao primjerice elektrokauterizacija proksimalne ili distalne MCA), mogu nost kontroliranja fiziolo-kih parametara i izazivanje reproducibilnih o-te enja.

Prepoznati izvori varijabilnosti uklju uju imbenike koji ovise o flivotinjama (odabir flivotinja po genotipu, dobi i spolu), vrijeme u danu za provo enje zahvata, variranje fiziolo-kih parametara flivotinje tijekom zahvata te razlike izme u osoba koje zahvate provode.

Mogu i nedostaci same metode uklju uju i puknu e krvne file s posljedi nnim subarahnoidalnim krvarenjem. Kako bi se ono svelo na najmanju mjeru komercijalna tvrtka Doccol (Sharon, MA, US) sudjeluje sa znanstvenicima u razvoju optimalnog oblika presvu enog filimenta. Standardizirali su presvlaku (presvlaka od poli-l-lizina ili silikona), oblik vrha filimenta (zaobljen, o-tar, koni an), teksturu i konzistenciju (mekana i savitljiva)ime su smanjili u estalost subarahnoidalnog krvarenja i standardnu devijaciju volumena ishemiske lezije (32).

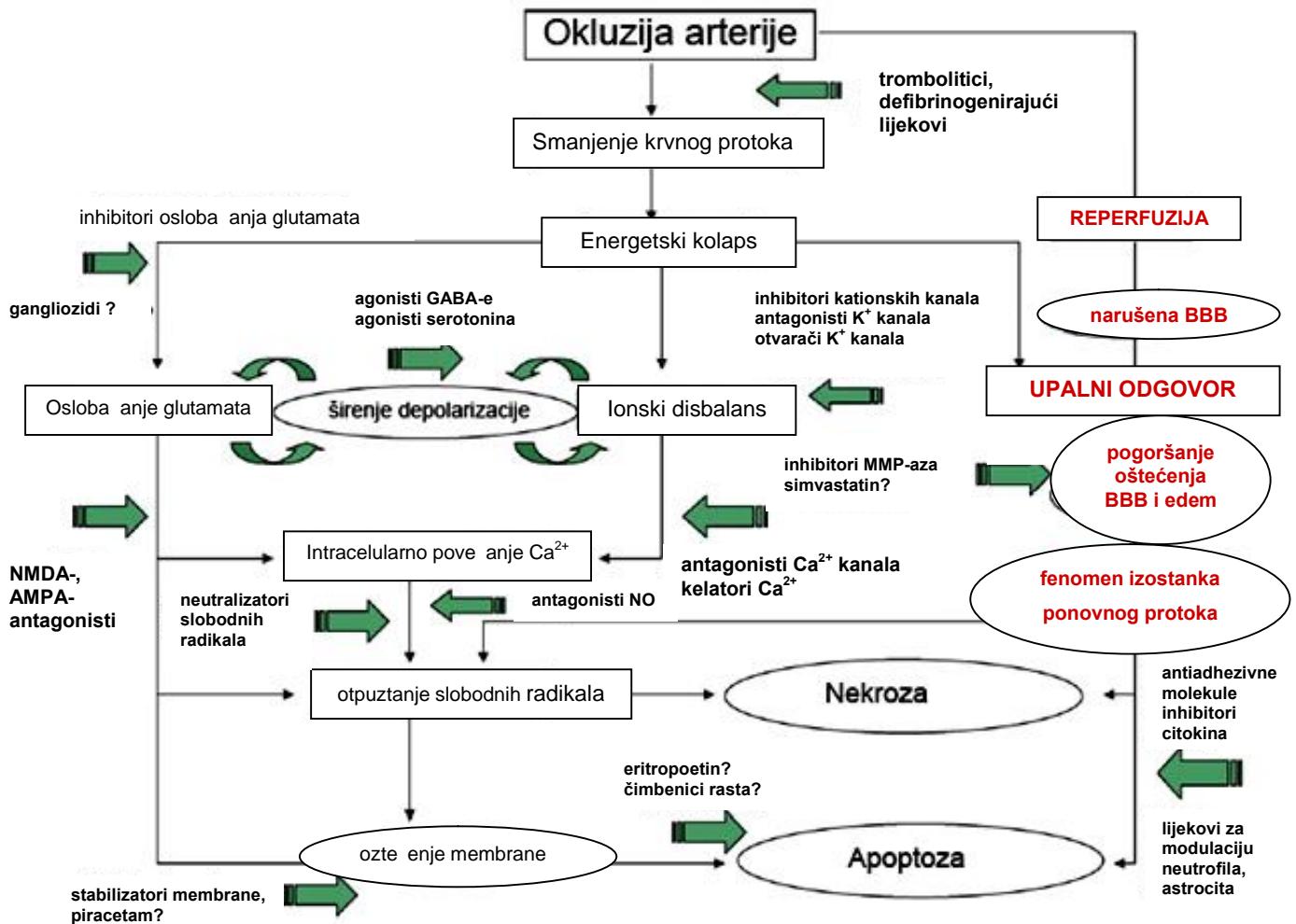
Ostale navedene izvore varijabilnosti svodi se na najmanju mogu u mjeru pra enjem protoka pomo u sustava laserskog doplera u teritoriju MCA, pra enjem fiziolo-kih parametara (disanje, tjelesna temperatura, hidracija), osiguravanjem istog operatera koji provodi zahvat te uklju ivanjem dovoljnog broja laftno operiranih kontrola.

Ne postoji standardni kirur-ki model koji bi zadovoljavao sve istrafliva ke potrebe. Naprotiv, obilje razli itih postupaka i varijacija istih doprinosi bogatstvu i raznolikosti u bazi nom istraflivanju te potom na razini zajedni kog rezervoara ishoda imitira stvarni problem oboljenja kod ljudi.

1.3. Akutna i odgodjena zbivanja u ishemijskom oštećenju mozga

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

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

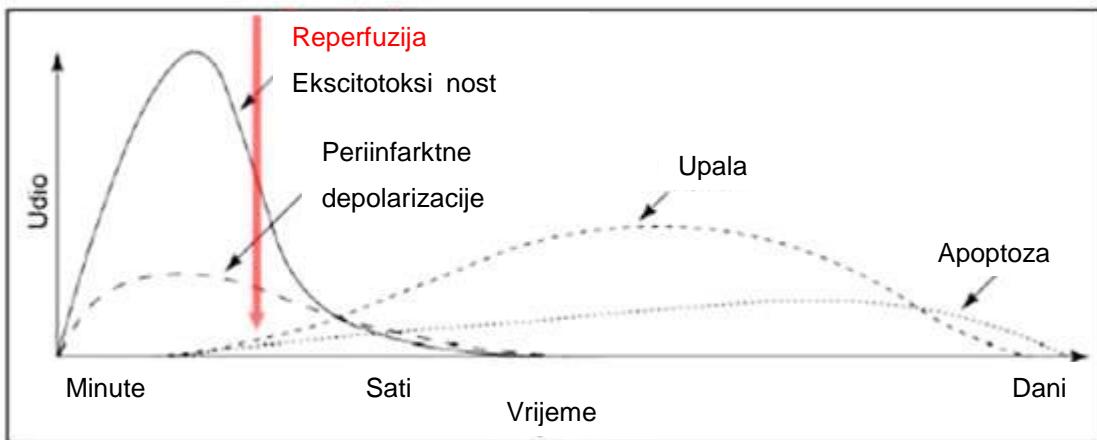


Slika 2. Različite sastavnice ishemijске kaskade koje se međusobno isprepliću. NO-dušični monoksid; GABA, gama aminomaslačna kiselina; NMDA, N-metil-D-aspartat; AMPA, alfa-amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol-4-propionska kiselina; MMP-aze, metaloproteinaze matriksa. Prilagođeno i preuzeto iz (30).

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

Po depolarizaciji glije i neurona uslijed energetskog kraha, dolazi do oslobaanja ekscitotoksičnih aminokiselina, poglavito glutamata koji ima svojstvo izravne neurotoksičnosti, ali i svojstvo neurotoksičnosti posredne djelovanjem na NMDA-, AMPA- i metabotropne receptore. To dovodi do daljnje neravnoteže elektrolita (unutarstanično povećanje Ca^{2+} , Na^+ i Cl^-) i edema (Slika 3.) (36). Povećana razina izvanstaničnog kalija i daljnje otpuštanje glutamata dovode do lančene depolarizacija koje troše dragocjenu energiju glukozom depriviranog tkiva i tako dovode do dalnjeg povećanja volumena nekroze (37, 38). Pored aktiviranih glutamatnih receptora koji su kanali za kalcij, unutarstanični kalcij raste zahvaljujući i naponskim kanalima te obrnutim radom natrij-kalcij izmjenjivača, ali se pri tom i otpušta iz unutarstaničnih izvora (ER, mitohondriji, sinaptički mjehuri) i te aktivacijom

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



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

1.3.2. Reperfuzija pojačava intenzitet upale i apoptoze neurona

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

Stoga postoji potreba za neuroprotektivnim lijekom koje se ne odnosi na revaskularizaciju, već pristup koji prekida ili usporava akutne patofiziološke mehanizme kad rt-PA nije indiciran (42). Rješenje se trafi u kombinaciji reperfuzije s neuroprotektivnom terapijom (hipotermija) u kojem bi se povratio normalni gradijent metabolita, a bez daljnje amplificiranja upale (43). Tijelo djelomice i samostalno provodi smanjenje reperfuzijskog ozljede, povećavajući i broj adhezivnih molekula za neutrofile na endotelu krvnih žila zahvaljujući području u kojem se u njima

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

1.3.3. Neurotoksična i neuroprotektivna svojstva upalnih čimbenika

Intenzitet i trajanje upale, koja dominira u subakutnoj fazi, ovisiće o razmjeru akutnih zbivanja ekscitotoksičnosti, depolarizacijama i oksidativnom stresu. Tako će se kratak i akutni prekid krvne opskrbe sa slabim oksidativnim i dužim opterećenjem brzo stabilizirati upravo zahvaljujući mehanizmima akutne upale te neće znati utjecati na dugoročno presviljenje neurona, dok će opsežnija ishemiska lezija dovesti do opetovanih i pojamih upalih zbivanja koja mijenjaju svoju prvobitnu korisnu funkciju (45).

1.3.3.1. Mikroglija kao središnja točka upale nakon ishemije

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

Prvi ih je opisao njemački liječnik i „otac moderne patologije“ Rudolf Ludwig Carl Virchow još 1856. kao „*nervenkitt*“ (njem. *nervenkitt*, hrv. ljepilo za livce) nazivajući ih neuroglija (46). U zrelog srednjem livljanom sustavu mogu se podijeliti na astrocite, oligodendrocyte, ependimalne stanice i mikrogliju (47).

Tradicionalno stajali-te smatralo je gliju pasivnim sudionikom u mofldanim funkcijama. Danas se ovo stajali-te uvelike promjenilo uslijed napretka tehnologije i akumulacije znanja o glijici. Stoga ove stanice na koje otpada 50 % stanica mozda imaju važne uloge aktivno oblikujući i modulirajući neurone (48).

Stanice mikroglijije, koje čine 20% svih glija stanica, prvi je opisao Franz Nissl (*njem. Stabenzellen*, hrv. –tapi aste stanice) 1880-ih godina, no „ocem mikroglijije“ smatra se Pío del Río Hortega (u enik Santiago Ramón y Cajala), koji ih je promatrao nakon otevrenja tkiva mozga te povezao sa znakama makrofaga (49, 50).

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

LIGANDI MIKROGLIJE	PRIMJERI
Površinske strukture i DNA/RNA virusnog, bakterijskog ili gljivičnog podrijetla	agonisti receptora koji prepoznaju uzorak (<i>engl. pattern recognition receptors</i> , PRR), među kojima su najvažniji receptori TLR1,-2,-3,-4,-6,-9: bakterijski LPS, proteoglikani stani nog zida i lipoteikoi na kiselina (<i>engl. lipotheicoic acid</i> , LTA), podjedinice ovojnica retrovirusa gp41 i gp120
Abnormalne endogene bjelančevine	agregati beta amiloida, A ₂₅₋₃₅ , A ₄₀ , A ₄₂ , prionski proteini
Komplement	sastavnice sustava komplementa C1q, C5
Protutijela	imunoglobulini raznih razreda i izotipova (IgG, IgA, IgM) predstavljenih u obliku imunoloških kompleksa
Citokini	imbenici stimulacije kolonija i citokini: M-CSF, GM-CSF, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN-, imbenik nekroze tumora- (<i>engl. tumor necrosis factor alpha</i> , TNF-), transformiraju i imbenik rasta- (<i>transforming growth factor-β</i> , TGF-) itd.
Kemokini	ligandi koji se veflu na kemokinske receptore: CCR3, CCR5, CXCR, CXCR2, CXCR4, CX3CR1, IL-8R
Neurotrofni čimbenici	neurotrofni imbenik porijeklom iz mozga (<i>engl. brain derived neurotrophic factor</i> , BDNF), neurotrofni imbenik porijeklom iz stanica glije (<i>engl. glia derived neurotrophic factor</i> , GDNF), imbenik rasta flivaca (<i>engl. nerve growth factor</i> , NGF), neurotrofini NT-3 i NT-4
Sastavnice krvne plazme	albumin, fibronektin, fibrinogen, trombin
Ostale bjelančevine i peptidi	apolipoprotein E (ApoE), proteini toplinskog -oka HSP60, HSP70, CD40L, hormon stimulacije melanocita (<i>engl. melanocyte stimulating hormone</i> , MSH), endotelin, S100 proteini, vazoaktivni intestinalni peptid (VIP)
Spojevi povezani s prijenosom podražaja živčanim stanicama	ATP i srodnii purini, -adrenergi ni agonisti, glutamat, kainat, NMDA
Ioni	ioni kalija i mangana (K ⁺ , Mn ²⁺)
Ostali spojevi	kanabinoidi, ceramidi, gangliozidi, lisofosfatidi na kiselina (<i>engl. lysophosphatidic acid</i> , LPA), melanin, endogeni opijati (endomorfini), imbenik aktivacije trombocita (<i>engl. platelet activating factor</i> , PAF), prostaglandin E2, steroidni hormoni

Dok makroglija potječe iz neuralne cijevi (ektoderm), podrijetlo mikroglije su hematopoetske mati ne stanice iz flumanjane vremene (ekstraembrionalni mezoderm) koje po diferenciji u primitivne makrofage koloniziraju neuroepitel (52). Primitivni makrofagi ulaze u osnovu za mozek s 9,5 tjedana embrionalnog razvoja (E9,5), prije nego što se krvno-močkovljana barijera kreće stvarati kod E13,5 (53).

Iako se mofle smatrati kako su sve stanice zate ene u podruju ishemije jednakomjerni sudionici upale, ukljujuju i novopristigle neutrofile i makrofage iz krvi, stanice mikroglije su zajedni ka konvergencijska to ka za podraflaje nastale u akutnom razdoblju, one se prve aktiviraju te stvojim raznovrsnim u incima igraju glavnu ulogu u odgo enim zbivanjima nakon ishemiske lezije (45). Njihova aktivacija nije jo-u potpunosti razja-njena, no smatra se kako raspad neurona zajedno s reaktivnim kisikovim radikalima dovodi do aktivacije ina e uspavane i miruju e razgranate mikroglije (54). Izraz „uspavana“ mikroglija nije u potpunosti opravdan, jer i u tom stanju mikroglija ima nadzornu ulogu stalno se pregra uju i u pretrazi vlastitog teritorija. O pretvaranju u aktivan ameboidni fenotip odlu uje prevaga niza vanjskih imbenika kao -to su bakterijski lipopolisaharid, LPS, podjedinice ovojnica retrovirusa gp41 i gp120, ali i unutarnjih imbenika kao -to su agregati beta amiloida, ATP, ioni kalija, citokini (Tablica 2.) (51).

Ve 2 sata nakon smrti prvih neurona, na mjestu ishemije nalazimo mikrogliju pretvorenu u rezidentne makrofage (55). Dok su neuroni izrazito osjetljivi na hipoksiju, mikroglija e pak i u srcu ishemiskog o-te enja nadflijjeti i neurone i astrocite, sve dok ishemija ne traje dufle od 90 minuta (55, 56). I mikroglija iz okolnih podruja bit e privu ena signalom o-te enih neurona te ih u bliskom kontaktu (*engl. capping, hrv. poklapanje*) obiljeftiti za budu u fagocitozu (57).

U aktivnom stranju, pored fagocitoze, mikroglija proizvodi upalne i citotoksi ne medijatore te tako poja ava o-te enje stanica i stani nu smrt. Primjerice, proizvodi citokine, male signalne molekule koje reguliraju stani ni rast, proliferaciju i diferencijaciju (58).

U zdravom su mofldanom tkivu citokini konstitutivno prisutni u malim, te-ko detektabilnim razinama, no nakon nastupa o-te enja, dolazi do brzog i intenzivnog poja anja njihovog izraflaja (26). U skupini proinflamatornih citokina navode se IL-1 β , TNF-alfa i IL-6, dok su protuupalni imbenici transformiraju i imbenik rasta- (*engl. Transforming growth factor- β , TGF- β*) i IL-10 (59).

Proizvodnja TGF- β i IL-10 govori u prilog hipotezi da bi aktivacija mikroglije mogla biti i neuroprotektivna (60). Primjerice, stanice mikroglije fagocitiraju neutrofile u o-te enom tkivu te tako sprje avaju daljnje osloba anje toksi nih medijatora (61). Osim neutrofila i rezidentni makrofagi, u koje se glica pretvorila, uklanjaju nekroti no tkivo i -tetne sastavnice debrisa.

K tome, stanice mikroglije proizvode neurotropne imbenike koji stimuliraju neurogenезu i plasti nost (58).

Takav razvoj doga aja ukazuje da je rana aktivacija glijalnih stanica –tetna za okolno tkivo, dok je kasnija korisna u pogledu uspostave zdrave stani ne okoline (45).

Prethodna istraživanja na–ih suradnika na transgeni ni mi–evima kod kojih je selektivnom ablacijom Mac-2 (galektin-3) pozitivnih stanica inhibirana proliferacija mikroglije pokazuju pove ani volumen infarciranog tkiva za 13% nakon ishemije od 60 minuta s reperfuzijom, –to ipak govori u prilog neuroprotektivnom djelovanju proliferiraju e mikroglije nakon ishemije (62).

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

1.3.3.2 Rezidentne stanice CNS-a u upali nakon ishemiskog oštećenja

Pored glavnog efektora upale, stanica mikroglije, u razvoju upale sudjeluju i makroglija (astrociti, oligodendrociti), perivaskularni makrofagi, dendriti ke stanice i mastociti, a od infiltriraju ih stanica prido–lih iz krvi valja spomenuti neutrofile, monocyte i limfocite.

1.3.3.2.1. Astrocyti

U zdravom mozgu astrociti ine najve i udio populacije glija stanica (80%), ali i svih stanica u mozgu op enito (50%) te se svojim oblikom razlikuju ovisno o dijelu mozga u kojem se nalaze (63). Tako u sivoj tvari nalazimo protoplazmatske astrocite s brojnim radijarnim stani nim nastavcima koji svojim noficama s jedne strane komuniciraju s neuronima, a s druge oblaflu krvne file i ine sastavnicu krvno-mofldane barijere (64). Fibrilarni astrociti, prisutni u bijeloj tvari, nisu u tako bliskom kontaktu s tijelima neurona te nemaju izraflenu ulogu tijekom ishemiskog o–te enja (65).

Astrociti pruflaju strukturnu, trofi ku i metaboli ku potporu neuronima te moduliraju sinapti ku plasti nost, –to je uvjetovano neposrednim kontaktom dvaju navedenih tipova stanica (66).

Otpornost astrocita na ishemiju u mofldanom tkivu tek malo prema–uje onu neurona, poglavito iz razloga –to su manje osjetljivi na hipoksiju te mogu anaerobno iskori–tavati glukozu proizvode i laktat (67). Njihov je zna aj, neposredno nakon nastupa ishemije, dokazan u ublaflavanju ekscitotoksi nosti glutamata aktivnim preuzimanjem glutamata Na^+ ovisnim transporterima (68).

U akutnom razdoblju od nekoliko sati od o–te enja bilo kakvog uzroka dolazi do hipertrofije i proliferacije astrocita koje se naziva reaktivna astroglioza (69), s pove anjem izraflaja njihovih strukturnih bjelan evina (GFAP, vimentin) te enzima poput dismutaze, glutation-

peroksidaze i metalotioneina –to poveava kapacitet astrocita za neutralizaciju ROS-ova (70, 71). Pored toga, poticanjem izraflaja hem-oksigenaze uklanjaju fletjezo iz hemaime tako er umanjuju oksidativni stres u sluaju hemoragijskog mofldanog udara ili konverzije ishemijskog u hemoragijski mofldani udar (66).

U razdoblju od nekoliko sati do nekoliko dana, s najveim intenzitetom tijekom 48-72 h, astrociti izraflavaju inducibilnu sintetazu du-i nog monoksida (*engl. inducible nitric oxide synthase*, iNOS) –to može doprinijeti odgo enom o-te enju neurona nakon ishemijskog o-te enja (72). Od upalnih citokina, astrociti proizvode TNF- α , IL-1, -6, -10 i IFN-, IFN- (73, 74). Istovremeno u odgo enom odgovoru na ishemijsko o-te enje astrociti proliferiraju, migriraju do ruba ishemijske lezije i sudjeluju u stvaranju glijalnog offiljka (75). Glijalni offiljak, kao i svaka barijera, ima dvojaki u inak: –titi neo-te eno tkivo, sprjeava –irenje upale i neizravno doprinosi kontroli sastava izvanstani nog okoli-a (76), dok je istovremeno fizi ka prepreka izrastanju neurita prema mjestu ishemijske lezije (77). Uslijed ispreplitanja djelovanja raznih imbenika, kao –to je primjerice izluivanje citokina iz raznih tipova stanica, preostaje tek ustanoviti to an doprinos astrocita upali.

1.3.3.2.2. Perivaskularni makrofagi

Citokine izluju i perivaskularni makrofagi te se smatra kako upravo oni svojom lokacijom utje u na izraflaj adhezivnih molekula na krvnim filama i posljedi nu infiltraciju upalnim stanicama (78).

1.3.3.2.3. Dendritičke stanice

Dendriti ke stanice su dio imunolo-kog sustava sisavaca ija je uloga predavanje antiga (*engl. antigen presenting cells*, APCs) na vlastitoj površini T-limfocitima te se smatraju glasnicima izme u uro ene i ste ene imunosti.

Ne nalazimo ih u zdravom mofldanom tkivu, ve u meningama, koroidnom spletu i likvoru. No, nakon podraflaja ishemijom one se po inju nagomilavati na periferiji (od rezidentnih dendriti kih stanica), ali kasnije i u samom središtu o-te enja (novoprdo-le dendriti ke stanice) (79).

1.3.3.3. *Infiltrirajuće stanice u upali nakon ishemijskog oštećenja*

1.3.3.3.1. Neutrofili

Neutrofilni granulociti najbroniji su tip leukocita (40%), proizvode se u ko-tanoj srsti od mati nih stanica i otpu-taju u krv odakle privu eni adhezivnim molekulama i citokinima

prianjaju uz endotel krvnih flila zahva enih upalnim zbivanjima te prolaze kroz stijenu krvnih flila (ekstravazacija). Uloga im je izlu ivanje upalnih imbenika i fagocitoza.

Uslijed velikog izraflaja E-selektina, koji je adhezijskam molekula za neutrofile, u malim krvnim flilama može nastupiti tzv. sindrom izostanka ponovnog protoka (*engl. no reflow phenomenon*) zbog za epljenja nagomilanih stanica koje se jo– nisu uspjele probiti u tkivo (80).

Infiltracija neutrofilima zapo inje ve unutar pola sata nakon ishemije, a dosefte vrhunac unutar nekoliko sati nakon ega ih zamjenjuje dominacija monocita/makrofaga (81, 82).

Svojom degranulacijom akutno otpu-taju iNOS, NADPH oksidazu, mijeloperoksidazu, te enzimi matriks-metaloproteinaze koji poja avaju upalu.

U odgo enim zbivanjima izlu uju velike koli ine slobodnih kisikovih radikala, proučalnih citokina (IL-1 , IL-6, TNF-), kemokina (MCP-1, MIP-1 , IL-8), elastaze, matriks-metaloproteinaze (uglavnom MMP-9), no njihov utjecaj na veli inu ishemijske lezije nije dokazan (83).

1.3.3.3.2. Makrofagi i limfociti

Upalni signal privla i i monocyte iz krvi koji se unutar 10-12 sati nakon ishemijske lezije pridružuju mikrogliji i gotovo ih je nemogu e morfolo-ki i funkcionalno razlikovati od rezidentnih makrofaga (aktivirana mikroglija) te zajedno s njima sudjeluje u uklanjanju stani nog debrisa neutrofila i nekroti nih stanica (84).

Limfociti pak ulaze u tkivo nakon otvaranja krvno-mofldane barijere te se uklju uju u komunikaciju s ranije spomenutim dendriti kim stanicama (85). To an vremenski slijed pojave pojedinih podvrsta limfocita tijekom ishemijskog o-te enja nije poznat, kao ni njihov krajnji u inak (86).

Pojedine stanice i signalne molekule uklju ene u upalu, ne mogu se smatrati isklju ivo neurotoksi nim ili neuroprotektivnim protagonistom postishemijskih zbivanja, ve e samo ravnotefta izme u njihovih „-tetnih" i „korisnih" u inaka pridonijeti kona nom pogor-anju ili oporavku ovisno o fiziolo-kom i biokemijskom kontekstu trenutno prisutnom u mofldanom tkivu (87).

1.4. Upala i receptori nalik na Toll

U obrani protiv patogena imunolo-ki sustav ovjeka ima na raspolaganju mehanizme uro ene i ste ene imunosti. Ste ena se imunost, specifi na za kraljeftnjake, oslanja na stvaranje imunolo-kog pam enja koje omogu uje prepoznavanje tijelu stranih antigena specifi nim

protutijelima. Dok uro ena imunost prisutna i kod beskraljeftnjaka, nije na taj na in specifi na za odre enu tvar, ve se u svojoj brzoj aktivaciji oslanja na ograni enu skupinu bjelan evina i fagocitne stanice koje prepoznaju konzervirana svojstva patogena (88).

1.4.1. Otkriće i filogenetska konzerviranost

Dok se ste ena imunost intenzivno istraflivala od kraja 19. stolje a, mehanizmi uro ene imunosti po eli su se rasvjetljavati tek krajem 1980.-ih godina.

Tad je za otkri e posebnog gena koji kodira razvoj dorzoventralne osi kod vinskih mu-ica (*Drosophila melanogaster*, Meigen) dodijeljena Nobelova nagrada za fiziologiju ili medicinu Christiane Nüsslein-Volhard i Ericu Wieschausu (89). Uspostavilo se da je isti gen, nazvan Toll (*njem. Toll*, odli no, super, „gubaõ), presudan za obranu vinskih mu-ica od gljivi ne infekcije (90).

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

Nastao tsunami istraflivanja TLR-ova je pokazao da su receptori nalik na Toll (*engl. Toll like receptors*, TLR) razred evolucijski o uvanih receptora uro ene imunosti koji su izrafleni u filogenetskom nizu sve od morskih jeflinaca pa do ljudi.

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

1.4.2. Struktura i izražaj

Bjelan evine iz TLR obitelji transmembranske su bjelan evine tipa 1 (s jednom regijom koja prolazi kroz membranu i izvanstani nim N-krajem) (94). Citoplazmatski dio koji pokazuje veliku sli nost s obitelji IL-1 receptora, naziva se Toll/IL-1 (TIR) domena. Osim te sli nosti, izvanstani no se me usobno razlikuju jer domena IL-1 receptora nalikuje na imunoglobuline, dok izvanstani na domena TLR-ova posjeduje leucinom bogata ponavljanja (*engl. leucine-rich repeats*, LRR) (95).

No, nisu svi TLR-ovi prisutni na stani noj membrani. Dok je to ve inom slu aj za TLR1, -2 , -4, -5 i -6, receptori TLR3, -7, -8 i -9 izrafleni su u unutarstani nim odjeljcima (29,45647) (96-98). No, ta podjela nije fundamentalna jer TLR2, -4 i -5 mogu biti internalizirani, a TLR9 se može pojaviti na stani noj povr-ini (93). Smatra se da su upravo unutarstani ni odjeljci (endosomi/lizosomi) mjesto prepoznavanja sastavnica patogena pomo u TLR-ova, ak i za membranski izraflene receptore (poput TLR2) (99).

TLR-ovi pokazuju diferencijalni histolo-ki, ali i stani ni profil izraflaja. Tako primjerice TLR3 ima kriti nu ulogu u penetraciji virusa Zapadnog Nila kroz krvno-mofldanu barijeru, a izraflaj TLR2 i -4 na endotelnim stanicama uzrokuje specifi nu osjetljivost na bakterijske ligande te usmjerava putuju e leukocite unutar tkiva (93).

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

Izraflaj TLR-ova se mijenja unutar pojedine stanice ovisno o izloflenosti okoli-nom stresu, patogenima ili citokinima. Primjerice lipopolisaharid, LPS i dsRNA (RNA dvostrukog lanca) pove avaju izraflaj TLR2 (101). Tako er, uo eno je i me udjelovanje unutar skupine TLR-ova, pa tako do koordiniranog pove anja TLR2 dovodi i aktivacija neutrofila putem TLR2 (102).

Od stanica prisutnih u CNS-u, o ekivanje je da mikroglija kao potomak monocitne loze izraflava receptore iz TLR obitelji, -to je i dokazano. Mikroglija sadrfli sve poznate TLR-ove i stimuliraju ih primjerice LPS (TLR4), peptidoglikan (TLR2), poliinozinska-policitidili na kiselina (TLR3) te CpG DNA (DNA koja sadrfli citozin i guanin u linearnom slijedu baza) (TLR9) (103).

No, i sami neuroni podrafleni pomo u interferona- (IFN-) i deprivacijom glukoze izraflavaju TLR2 i TLR4, te navedeni receptori u kortikalnim neuronima posreduju aktivaciju puta aktiviraju e bjelan evine Janus kinaza-1 (*engl. Janus Kinase activating protein-1*, JNK-AP-1) i kaspaze-3 (104). Postavlja se pitanje postoje li stanice koje ne izraflavaju TLR receptore ukoliko su podraflene na odgovaraju i na in.

1.4.3. Signalni put

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

Primjeri PAMP-ova koji se veflu na TLR-ove porijeklom su iz bakterija, gljivica, protozoa i virusa kao -to su LPS, flagelin (iz bi eva bakterija), peptidoglikan i sl.

Dok su DAMP-ovi koji pokre u signalni put TLR-ova endogeni proizvodi vlastitih raspadnutih stanica nakon nekroze. U njih spadaju molekularni -aperoni (*engl. heat shock protein*, HSP, bjelan evine toplinskog -oka) -60, -70, -90, HMGB1, heparan sulfat

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

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

Signalni put TLR-ova zapo inje TIR domenom te uklju uje jednu od 4 adaptorskih bjelan evina (Slika 4) (108):

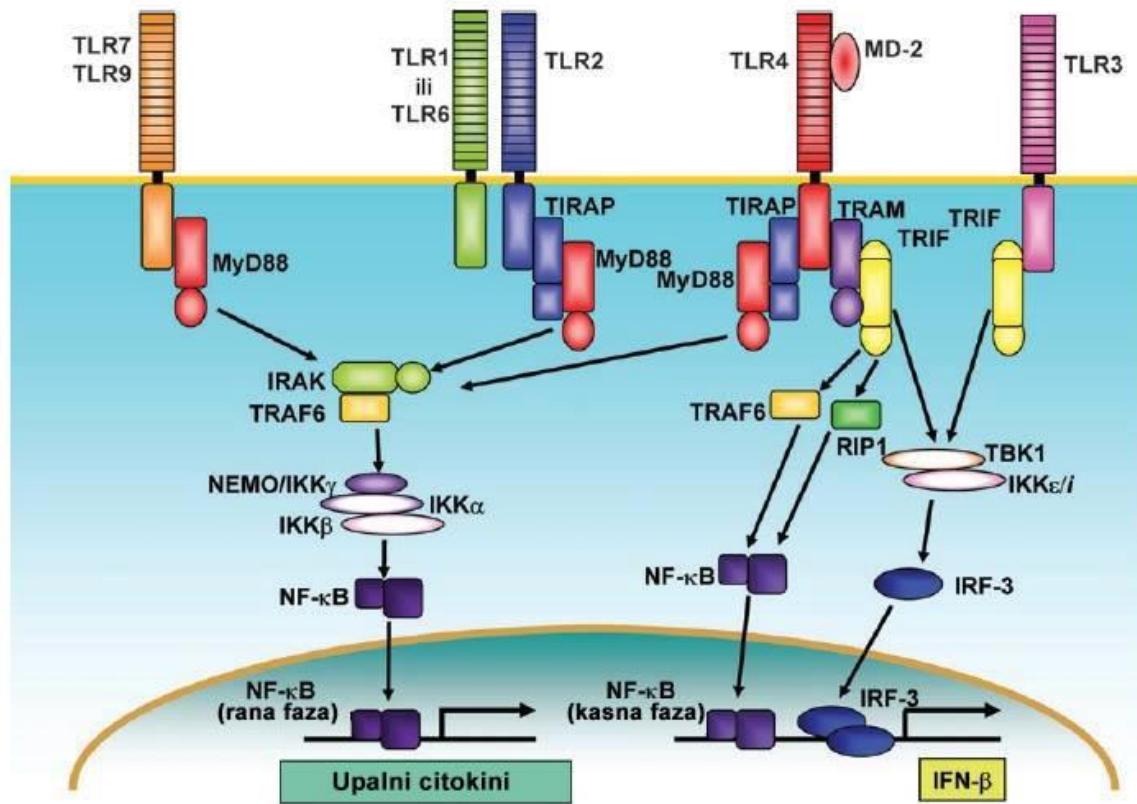
- **MyD88** (*engl. myeloid differentiation factor 88*, mijeloidni imbenik diferencijacije),
- **MAL/TIRAP** (*engl. MyD88-adaptor-like/TIR-associated proteins*, bjelan evine nalik na MYD88 adaptor povezane s TIR-om)
- **TRIF** (*engl. Toll-receptor-associated activator of interferons*, aktivator interferona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

Put preko adapterske molekule MyD88 prihva a i signal IL-1 receptora, obzirom da i oni posjeduju TIR-domenu. MyD88 povezuje kinazu-4 povezani s receptorom za interleukin-1 (*engl. interleukin-1 receptor-associated kinase 4*, IRAK4) s TLR-om i facilitira fosforilaciju IRAK-1. Aktivirani IRAK-1 se potom vefle za imbenik povezan s receptorom za TNF-6 (*engl. TNF receptor-associated factor 6*, TRAF6).

Potom se aktiviraju 2 puta: 1. vodi u aktivaciju transkripcijskih imbenika za AP1 preko MAP kinaza; a 2. aktivira TAK1/TAB kompleks (*engl. Transforming growth factor beta-activated kinase 1*, kinaza aktivirana transformiraju im imbenikom rasta beta 1/ *engl. TAK1-binding protein 2*, bjelan evina koja vefle TAK1) koji poja ava aktivnost kompleksa kinaze I B (*engl. I κ B kinase complex*, IKK). IKK inducira fosforilaciju i posljedi nu degradaciju I B -to dovodi do premje-tanja nuklearnog imbenika B (engl. nuclear factor- B, NF- B) u jezgru (110).

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

potpunosti poznati i jo- uvijek su predmet istraživanja, jer se, primjerice, pokazalo da imunolo-ke funkcije TLR-a ovise o kontekstu: u slu aju invazije patogena imaju glavnu ulogu u pokretanju i koordinaciji u inkovitog imunolo-kog odgovora, dok tijekom asepti kog o-te enja pokazuju -tetno djelovanje okidaju i isti upalni odgovor (112).



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

1.5.Signalni put ovisan o TLR2 u postishemijskoj upali mozga

U postishemijskoj upali, unutar TLR porodice, TLR2 ima najve i porast izraflaja (152-154), a u tome ga slijede TLR4 i -9. Kako je ishemijsko o-te enje mozga primarno asepti no, jedini dostupni ligandi specifi ni za TLR2 endogeni alarmini, odnosno DAMP-ovi: HSP60, HSP70, HMBG1 i stani ni fibronektin(113-115). Spajanjem s ligandom i heterodimerizacijom s TLR1 ili -6 nastupa signalna kaskada kojoj je svrha poja avanje i modulacija unutarstani nih

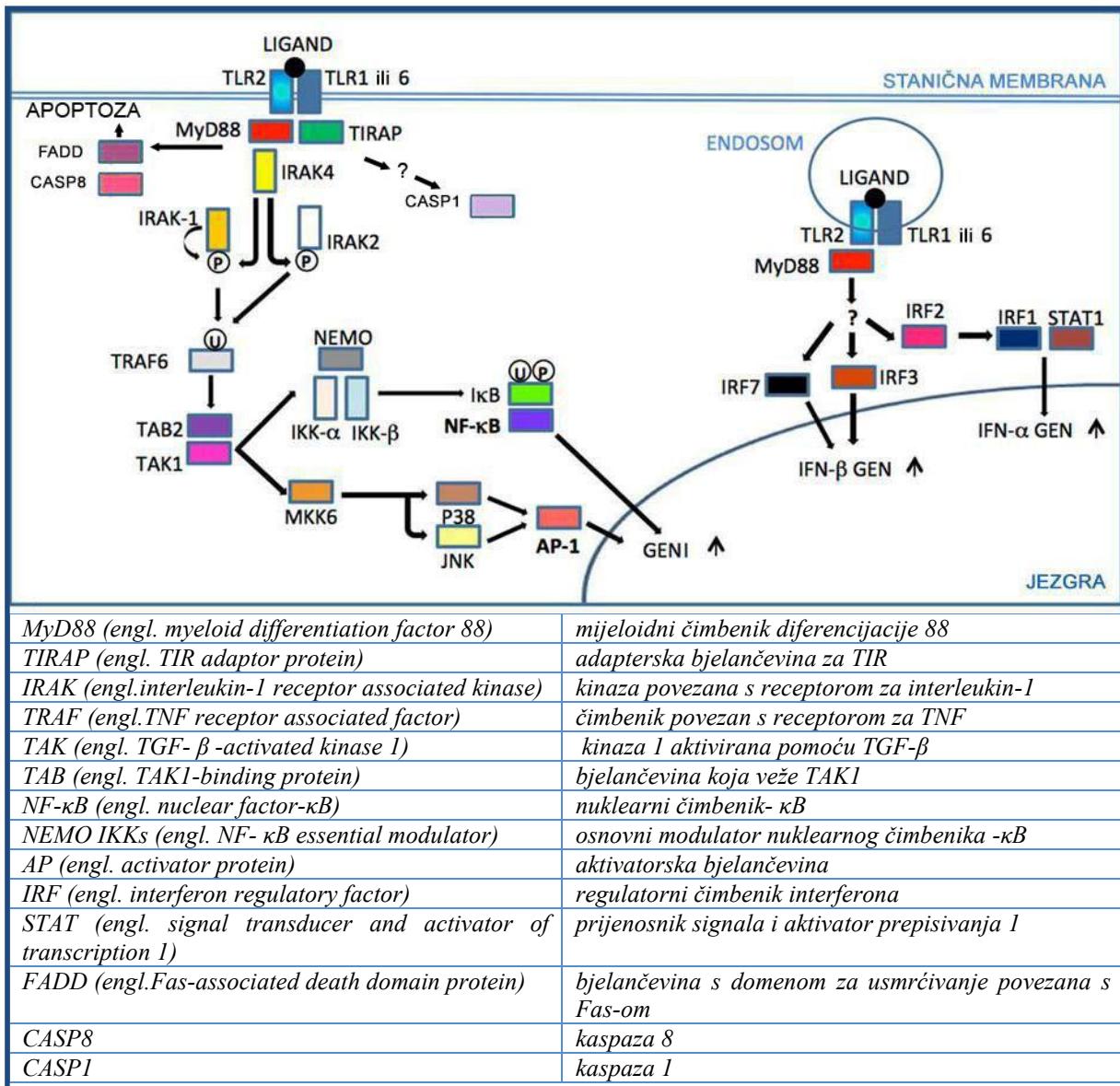
glasnika te postupno dovodi do poja anog otpu-tanja IFN-, IFN-, IL-1 i IL-6 (Slika 5.) (116, 117).

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

Dosad su se promatrati izraflaji gena signalnog puta TLR2 u akutnoj fazi nakon ishemijskog o-teženja mozga te pokazali kako manjak TLR2 u akutnom razdoblju nakon flajne ishemije smanjuje veliku leziju, a ne utječe na regрутiranje granulocita u zahvaljujući području te da je TLR2 na mikrogliji presudan za izređenje o-teženja (116, 117, 119). Obzirom da je pokazano i kako poja ani izraflaj TLR2 postoji i u kroničnoj fazi nakon ishemije, jedan od ciljeva ovog doktorata je pro-iriti analizu modulacije mRNA ovisnih o TLR2 u odgoju enoj fazi oporavka (62).

Prethodna istraživanja pod vodstvom prof. Jasne Krifl provedena na mi-evitama s onemogućenim *Tlr2* genom (*Tlr2-/-*) pokazala su kako aktivacija stanica mikroglije/makrofaga ovisi o funkcionalnom TLR2 receptoru. TLR2 potom sudjeluje i u proliferaciji stanica mikroglije, te u regрутiranju upalnih stanica monocita/makrofaga i limfocita iz cirkulacije (120). U longitudinalnom prvenstvu do kasnih vremenskih tokova odgovora i kroničnog oporavka pokazalo se kako je velika ishemijska o-teženja ipak veća kod mi-evitama bez djelatnog TLR2. Tako je, kod mi-evitama s onemogućenim *Tlr2* genom smanjeno je nakupljanje astrocita na području oko ishemijske lezije.

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



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

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

1.6. Pretkliničko snimanje laboratorijskih životinja

Zajedno s razvojem flivotinjskih modela za bolesti ljudi raste i potreba za neinvazivnim pravim enjem patofizioloških procesa samog oboljenja, ali i primjenjene potencijalne terapije na pojedinoj flivotinji. Postojale su tehničke zaprteke za uinkovitu uporabu modela, obzirom na malu veličinu glodavaca kao najčešće upotrebљavanih laboratorijskih flivotinja, te potrebu za velikom prostornom razlučivošću. Razvojem tehnologija sa pojamom omjerom signala i -uma te snaflnjim detektorima, danas se u pravenu oporavku mičeva nakon ishemijskog oštećenja uspešno koriste oslikavanja pomoći u:

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

Bioluminiscencija je ipak jedina neinvazivna metoda kojom je moguće pravene izrafljaje pojedinih gena *in vivo*, koja je k tome osjetljivija, prilagođena za flivotinje, te lakša za korištenje u usporedbi s ostalim modalitetima oslikavanja (128).

1.6.1. Primjena bioluminiscencije u biomedicinskim istraživanjima

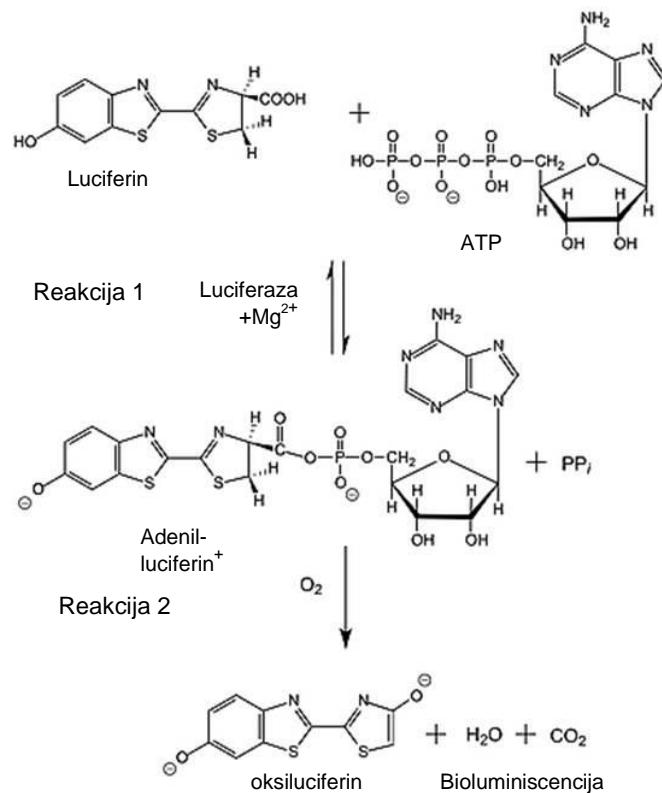
Bioluminiscencija je oblik kemiluminiscencije prisutan u brojnim morskim flivotinjama, insektima i bakterijama (Slika 6).

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

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

Najpoznatiji sustav bioluminiscencije pripada Sjevernoameričkim krijesnicima (*Photinus pyralis*, L.) te su na toj vrsti u posljednjih 50 godina ustanovljene osnove bioluminiscentnih

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



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

1995. godine Contag i suradnici su prvi put *in vivo* pratili bioluminiscenciju na sisavcima, mi-evima inficiranim salmonelom koja izraflava luciferazu. To im je omoguilo praćenje razvoja i tijeka infekcije u stvarnom vremenu, bez flitrovanih flivotinje u pojedinim vremenskim tokama (132).

1.6.2. Oslikavanje bioluminiscencije na modelu ishemijskog oštećenja mišjeg mozga

Ubrzo su stvoreni i sami transgeni mi-eki u kojima je gen za luciferazu poslužio umjesto dotad prisutnog reportera beta-galaktosidaze (gen Lac-Z). Prvi transgeni mi-za pružaju izraflajući gena bioluminiscencijom prikazivaju aktivaciju gena za Nf-kB koji ima ulogu

regulatora imunosti te poti e prepisivanje preko 150 razli itih citokina, imunoreceptora, bjelan evina akutne reakcije, regulatora stani nog ciklusa i apoptoze (133).

U posljednjih 20 godina razvijeno je nekoliko transgeni nih mi-jih modela bioluminiscencije i fluorescencije specifi nih za pra enje upale, o-te enja i stresa neurona te njihovog oporavka. Izme u ostalih namjena, reporterski sustavi kori-teni su kao biomarkeri aktivnih patolo-kih doga aja nakon ishemijskog o-te enja (62, 120, 134); za provo enje testa probira novih biokompatibilnih molekula (135); te za analizu patogenih procesa u ranoj fazi kao i za pra enje u inkovitosti terapije u kroni nim neurolo-kim poreme ajima (136, 137).

Tako je, primjerice, u ve ranjem spomenutom istraflivanju kori-ten reporterski sustav *Tlr2-luc-Gfp* za prikaz aktivacije mikroglije u akutnim vremenskim to kama nakon ishemijske lezije (62).

1.6.3. Snimanje izražaja *Gap43* u mozgu

Promatra li se funkcionalni oporavak i pra enje neurolo-kog deficit, u ijoj je osnovi preflivljavanje i umreflavanje neurona, bilo je potrebno prona i odgovaraju i reporterski sustav specifi an upravo za navedene stanice u podraflenom aktiviranom stanju.

Kao gen kandidat pokazao se *Gap43* obzirom na svoj pove ani izraflaj nakon o-te enja aksona i regenerativnog odovora u zrelem sredi-njem fliv anom sustavu (138).

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

GAP43 (engl. *growth-associated protein-43*, bjelan evina povezana s rastom 43, poznata i kao B50, F1, neuromodulin, pp46 i P-57) je bjelan evina povezana s rastom neurona tijekom razvoja i regeneracije fliv anog sustava. Poti e nakupljanje F-aktina u neuritima (aksonima) ime doprinosi izgradnji citoskeleta (139, 140). Izraflaj gena *Gap43* je najve i tijekom kriti nih razdoblja razvoja fliv anog sustava (141, 142).

Perinatalno je izraflen u svim neuronima, no njegov izraflaj opada sa smanjenjem arborizacije aksona i sinaptogeneze te preostaje samo u regijama visoke plasti nosti, kao -to su hipokampus i nju-na lukovica (olfaktorni bulbus) kod mi-eva (143).

Tako er, izraflaj *Gap43* je izrazito poja an kod odraslih ozlike enih neurona kao dio regeneracije, -to je opisano kod ozljede perifernih flivaca, kraljeftnice, ali i mozga (138, 144-146). Osim toga, zanimljivo je kako je poreme aj regulacije *Gap43* prisutan u

neurodegenerativnim poreme ajima, kao -to su Alzheimerova bolest, multipla skleroza i amiotrofi na lateralna skleroza (147-151).

Prethodna istraflivanja k tome ukazuju kako je pove an izraflaj *Gap43* prikladan biljeg za procjenu o-te enja aksona i regenerativnog odgovora neurona u zrelo sredi-njem fliv anom sustavu (138).

Nedavno se pokazala i nova uloga bjelan evine GAP43 kao supstrata za kaspazu-4 (CASP3). Tako er, mutacija *Gap43* gena uzrokuje smanjenu endocitozu receptora 1-amino-3-hidroksi-5-metil-4 izoksazelpropinske kiseline (engl. *1-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*, AMPA) dovode i do poreme ene dugotrajne depolarizacije na razini postsinapti ke membrane (152).

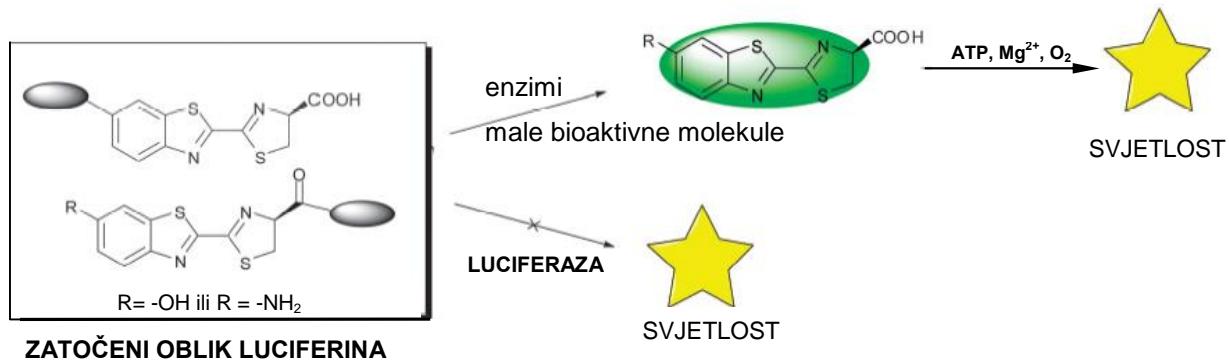
Kako bi se istrafila prostorno-vremenska dinamika indukcije *Gap43* u o-te enju mozga stvorena je transgeni na mi-ja linija koja sadrfli bicistronski reporterski sustav (luciferaza 2, luc2; zelena fluorescentna bjelan evina, green fluorescent protein, GFP) pod izraflajem promotora za *Gap43* u Laboratoriju Zavoda za psihijatriju i neuroznanost Istrafliva kog centra Sveu ili-ta Laval u Quebecu, u kojemu je proveden dio istraflivanja prikazanog u ovoj disertaciji (vidi poglavlje Uzorci i postupci, Transgeni na mi-ja linija GAP43-luc/gfp).

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

Sustav je potvr en promatranjem izraflaj gena *Gap43* gena tijekom embrionalnog razvoja kad je normalno prisutan, ali je ustanovljena i postishemija dinamika istog gena s porastom u akutnom razdoblju i odgo enim blagim poja anjem izraflaja (127).

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

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



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

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

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

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

Njegova primjena u flivom mišu koji selektivno izraflava luciferazu u odabranoj populaciji neurona predstavlja bi osjetljiv pokazatelj intenziteta zbijanja nakon ishemijskog osetila upu uju i na primjenu odgovarajućih terapijskih pristupa u točno određenom vremenskom prozoru. Takva bi orientacija mogla posluftiti u poboljšanju istraflivanja neuroprotektivnih lijekova koji su se ranije primjenjivali neovisno o molekularnim zbijanjima unutar neurona.

2. HIPOTEZA

Hipoteza ovog istraživanja bila je da djelovanje TLR2 nakon ishemijskog o-te enja mi-jeg mozga poti e funkcionalni oporavak i reaktivnu sinaptogenezu.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Opći cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj TLR2 kao posrednika uro enog upalnog odgovora na oporavak mi-eva i sinaptičke plastičnosti nakon ishemijске ozljede.

3.2. Specifični ciljevi

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

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Usklađenost s etičkim smjernicama i zakonskim propisima

Svi postupci provedeni za ovaj doktorski rad odobreni su od Eti kog povjerenstva Sveu ili-ta u Zagrebu, Medicinski fakultet i u skladu su s naputcima Eti kog kodeksa Hrvatskog dru-tva za znanost o laboratorijskim flivotinjama, koji je uskla en sa naputcima Me unarodnog vije a za znanost o pokusnim flivotinjama (International Council for Laboratory Animal Science).

Istraflivanje je provedeno u skladu s odredbama Zakona o za-titi flivotinja (NN 135/06) i 1. 9 Pravilnika o uvjetima drflanja pokusnih flivotinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa (NN 176/04).

Svi eksperimentalni postupci izvedeni u Kanadi odobreni su od Eti kog odbora za brigu o flivotinjama Sveu ili-ta Laval (Laval University Animal Care Ethics Committee), te su u skladu s Vodi em za skrb i uporabu pokusnih flivotinja Kanadskog vije a za skrb o flivotinjama (The Guide to the Care and Use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal Care) (154).

4.2. Plan istraživanja s vremenskim točkama

U istraflivanju je kori-teno ukupno 155 mi-eva.

Vremenske to ke koje su se prou avale su sam dan izazivanja ishemije (0) za mjerjenje po etnih vrijednosti te 1, 3, 4, 7, 14 i 28 dana nakon MCAO (Tablica 3).

Za procjenu veli ine ishemische lezije kori-tena su po 3 Gap43tg mi-a u 2 vremenske to ke (1,4 dana) (ukupno 6 mi-eva).

Za prou avanje funkcionalnog oporavka odabrane su vremenske to ke od 3,7,14 i 28 dana te su oblikovane 4 pokusne skupine. Pojedine skupine su se sastojale od 10 mi-eva divljeg tipa C57Bl/6, 10 mi-eva s onemogu enim Tlr2 genom (skra eno Tlr2/-), a kontrolne skupine su se sastojale od lafno operiranih mi-eva divljeg tipa (5 mi-eva) i lafno operiranih Tlr2/- (5 mi-eva) (ukupno 30 mi-eva).

Za prouavanje broja aksona 28 dana nakon MCAO oblikovale su se 4 pokušne skupine s Thy1 mi-evima s MCAO (4), Thy1Tlr2-/ mi-evima s MCAO (4) , te kontrolne skupine s lažno operiranim mi-evima Thy1 (3 mi-a) i lažno operiranim Thy1Tlr2-/ mi-evima (3 mi-a) (ukupno 14 mi-eva).

Za izolaciju mRNA za kvantitativni real-time RT-PCR kori-tena su po 3 mi-a po genotipu (2 genotipa WT, Tlr2-/) po vremenskoj toku (4 vremenske točke: 0, 3,7,28 dana)(ukupno 24 mi-a).

Za izolaciju bjele evina za Western blot kori-teno je po 5 mi-eva po genotipu (2 genotipa: WT, Tlr2-/) po vremenskoj toku (5 vremenskih točaka: 0,3,7,14,28 dana) (50 mi-eva).

Za procjenu izraflaja i kolokalizacije GAP43 i CASP3 kori-teno je po 5 Gap43tg u 3 vremenske točke (0,1,4 dana) (ukupno 15 mi-eva)

Za pokuse snimanja bioluminiscencije kori-tena su ukupno 4 *Gap43-luc/gfp* transgeni na mi-a (skraćeno u tablici Gap43tg).

Eti kučki krajnju toku tijekom pokusa dostiglo je 5 flivotinja, te su one uklonjene iz ispitivanja. Na temelju prethodne perfuzije teritorija MCA pomoći u LDF-a iz ispitivanja je uklonjeno 7 flivotinja.

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

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

4.3. Pokusne životinje

U istraživanju su korišteni miševi stari od 2 do 4 mjeseca i to isključivo muffjaci kako bi se izbjegao neuroprotektivni u inak estrogena kao imbenik posredne povezanosti(134).

Sojevi koji su se koristili u pokusima su sljedeći:

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

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

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

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

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

Podsoj C57Bl/6 odvojio se od C57Bl/10 oko 1937. godine te postao najpopularniji za uporabu u znanstvenim istraživanjima od svih prethodnih podsojeva. To je postao inercijom: velik broj po etnici istraživanja koja su provodila na njemu, dovela su do daljnji opsežnijih istraživanja. Dostupni su za nabavku u više od 20 ustanova koje ih uzgajaju diljem

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

Krzno im je crne boje. Ostale vafne zna ajke su visoko preferiranje morfina i alkohola, niska incidencija tumora mlijek ne flizije, otpornost na audiogene napadaje, visoka podlofnost razvijanju ateroskleroze inducirane dijetom, visoka incidencija mikroftalmije, visoka podlofnost razvoja kroni nog ulceroznog dermatitisa i gubitka sluha uzrokovanog bukom. Otporni su na zra enje, anafilakti ki -ok. Prosje na veli ina legla je 6-8 mladih, a odvajanje od legla nastupa s 20 dana starosti (155). U dalnjem tekstu rada se ozna avaju kao divlji tip, odnosno WT (*engl. Wild Type*).

4.3.2. Miševi s onemogućenim *Tlr2* genom (Tlr2-/-)

Mi-evi s onemogu enim *Tlr2* genom (Tlr2-/-) na C57Bl/6 podlozi su nabavljeni od tvrtke The Jackson Laboratory, soj B6.129-Tlr2^{tm1Kir}/J. Vektor s genima za rezistenciju na neomicin i timidin kinazu *Herpes Simplex* virusa ciljano prekida gensku sekvencu koja kodira C-kraj izvanstani ne i dio transmembranske domene. Konstrukt je elektroporiran u embrionalne stanice soja 129/SvJ. Embrionalne stanice koje su ispravno ugradile konstrukt su potom injicirane u blastocistu mi-a soja C57BL/6.

Homozigoti su normalne veli ine, ne pokazuju krupne tjelesne anomalije ili anomalije pona-anja, no prilikom podraflaja antigenima spiroheta, kao -to je LPS, ne razvijaju simptome bolesti jer ne proizvode TNF-alfa, ni IL-6 (156).

4.3.3. Transgenična mišja linija Gap43-luc/gfp

Transgeni na mi-ja linija Gap43-luc/gfp generirana je na Platformi za generiranje transgeni nih mi-eva u sklopu Istrafliva kog centra Klini kog bolni kog centra Sveu ili-ta Laval (CHUL), na C57Bl/6 podlozi.

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

izolirani kao fragment *Spe1/Clal* i mikroinjektirani u mu-ki pronukleus oplo ene oocite C57BL/6(127).



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

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

Soj B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J je poznat i pod nazivom Thy-1 YFP-16 (skra eno Thy1). Proizveo ga je Joshua R. Sanes, sa Sveu ili-ta Harvard, US na podlozi C57Bl/6 te donirao tvrtki The Jackson Laboratory.

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

Ova transgeni na linija izraflava flutu fluorescentnu bjelan evinu (engl. *yellow fluorescent protein*, YFP) u visokoj razini u motornim i osjetnim neuronima, te podvrstama neurona sredi-njeg fliv anog sustava. Transgeni na linija tako posjeduje snaflan i specifi an vitalni biljeg aksona, a izraflaj je snaflan ve od srednje gestacijske dobi(157).

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

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

Soj Tlr2-/ B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J (skra eno Thy1Tlr2/-) dobiven je sparivanjem soja Tlr2-/ i Thy1 kroz 2 generacije te dalnjim sparivanjem s Tlr2/-. Mi-evi su se za sparenja i pokuse identificirali pomo u lan ane reakcije polimerazom.

4.4. Kriteriji za isključivanje životinja iz ispitivanja

Kriteriji za isključivanje životinje iz ispitivanja su bili sljedeći:

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

Kriterij pod IV. tokom zahtjeva dodatno pojasnjenje. Na dosezanje humane krajnje točke upućuju znakovi moribundnog stanja životinje(159):

- a. Nesposobnost uzimanja vode i hrane
- b. Brzi ili znatan gubitak teflina ($>20\%$)
- c. Odsustvo voljnih reakcija na podraflaj
- d. Oteflano disanje
- e. fijutica ili anemija (bljedilo)
- f. Krvarenje iz bilo kojeg tjelesnog otvora
- g. Nesposobnost uspravljanja
- h. Zgranični poloflaj
- i. Poliurija ili anurija
- j. Atrofija mišića
- k. Tremor, grčevi, kljenut
- l. Produljena hipo- ili hipertermija

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

4.5. Genotipizacija miševa

4.5.1. Izolacija DNA iz tkiva

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

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

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

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

4.5.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

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

25 µl reakcijske smjese za jedan uzorak sadrflavalо je:

2 µl DNA

2,20 µl 25 mM MgCl₂

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

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

0,5 µl 25 mM dNTP

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

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

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

Genotip	Po etnice za soj	Po etnice za divlji tip C57Bl/6
Tlr2-/-	5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTCT-3' 5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3' (Neo alel)	5'-TGGTTCTTTCCCAAACCTGG-3' 5'-CAATGGGAATCCTGCTCACT-3'
Gap43	JK3: 5'- GGCGCAGTAGGCAAGGTGGT-3' 5'-GGGCACATCCTCTCATTTGT-3' (luc alel)	JK4: 5'-CAGCAGGATGCTCTCCAGTCC-3' 5'-GGGCACATCCTCTCATTTGT-3'
Thy1	5' - CGGTGGTGCAGATGAAC T - 3' i 5' - ACAGACACACACCCA GGACA - 3'	5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT -- 3', 5' -GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3'

Reakcija se odvijala u laboratorijskom uredu za PCR (Eppendorf Mastercycler), pod sljedećim uvjetima navedenim u tablici 5.

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

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

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

4.6. Metoda privremene MCAO kod miša kao model ishemiskog oštećenja mozga

4.6.1. Osnovne značajke korištenog MCAO modela

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

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

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

4.6.2. Inhalacijska anestezija

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

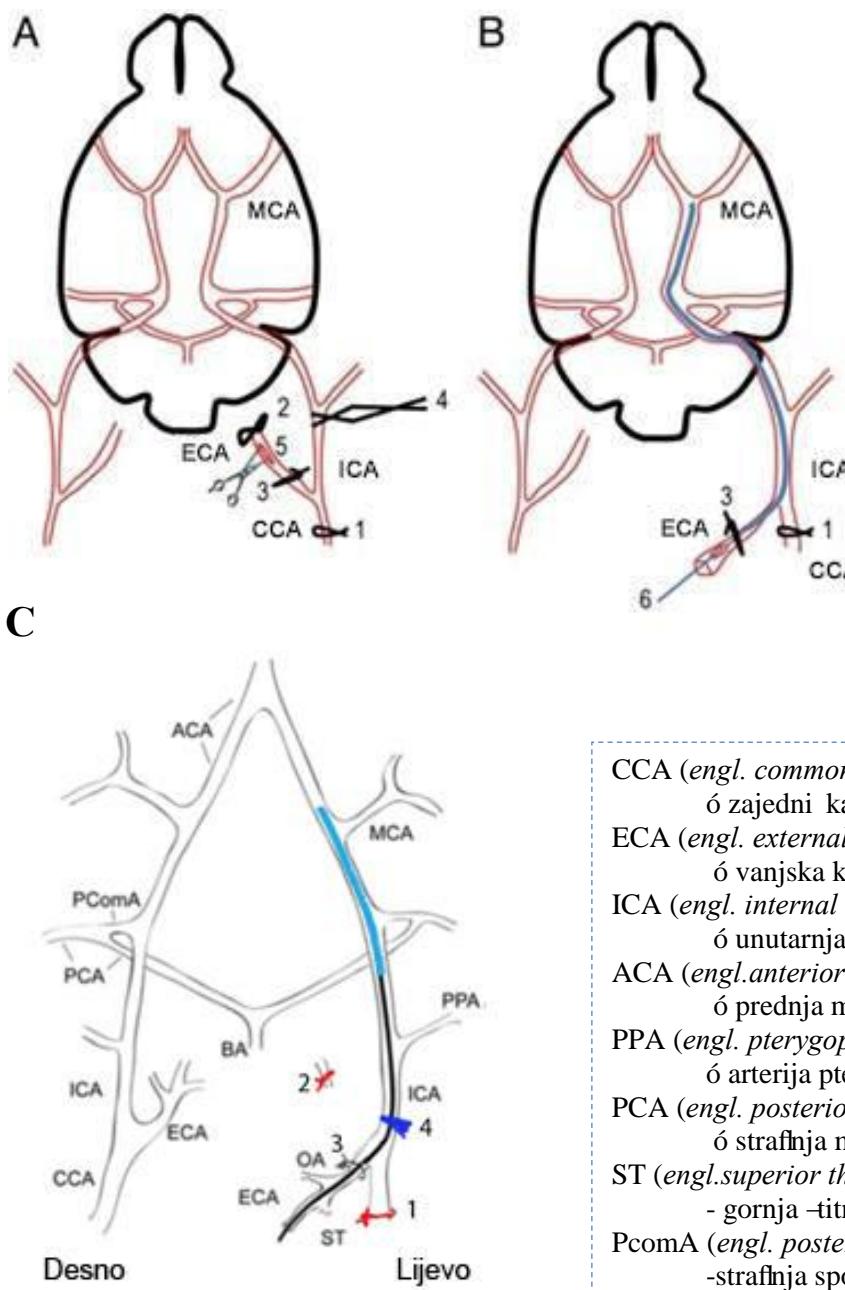
4.6.3. Izbjegavanje čimbenika posredne povezanosti pri MCAO

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

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

Kako bi se spriječilo isušivanje očne sluznice, mišić su po uspavljanju oči zatvorene i premazane zaštitnom masti, belobaza.

4.6.4. Opis MCAO zahvata



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

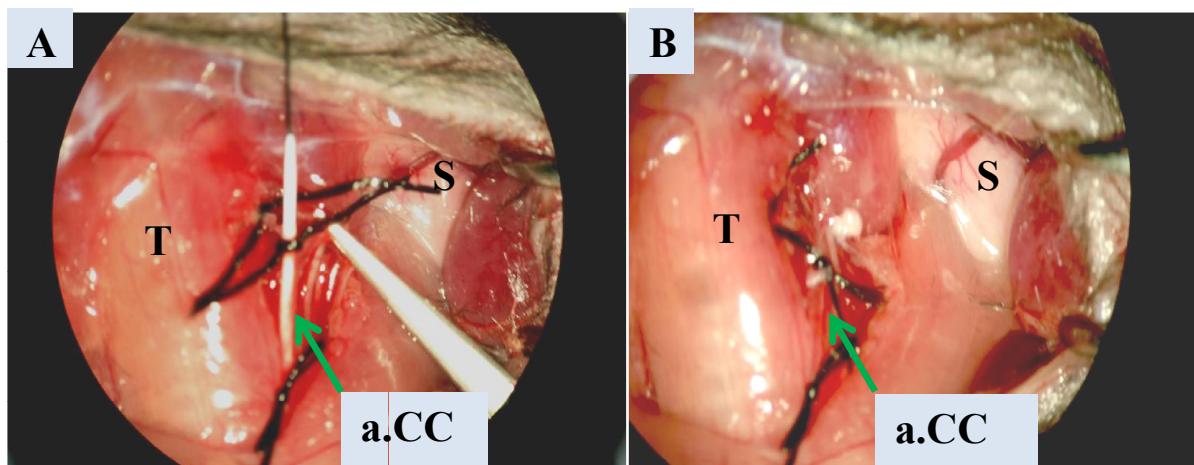
A) Položaj prvog čvora (1) na zajedničkoj karotidnoj arteriji (CCA), drugog (2) i (3) čvora na vanjskoj karotidnoj arteriji (ECA), položaj samozatvarajuće pincete (4) i mjesto reza. **B)** Položaj monofilamenta prilikom okluzije kada blokira ulazak krvi u središnju moždanu arteriju (MCA), položaj prvog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

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

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

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

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



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

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

4.6.5. Postoperativna njega

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

4.6.6. Lažno operirane životinje kao kontrole

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

4.6.7. Uporaba laserskog doppler sustava za provjeru protoka u MCA

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

4.7. Testovi ponašanja miševa

4.7.1. Uvjeti za provođenje testova ponašanja

Radi privikavanja miševa na ispitivači uređaje za ispitivanje, testovi ponašanja potrebni su provoditi, uz mjerjenje tjelesne tepline, 2 tjedna prije samog zahvata. Ispitivači su bili slijepi za genotip i tretman flivotinja, odnosno nije im bila poznata u koju skupinu miševi pripadaju.

Radilo se u skladu s opštim pravilima rada u flivotinskoj nastambi koja uključuje zabranu hrane, guma za flakanje, piće i kozmetike. Cijelo vrijeme nosila su se zaštitna odijela, maska i kapa te zaštitne rukavice, a uređaji su se temeljito istigli deterentom i alkoholom nakon svake ispitivane flivotinje.

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

4.7.2. Procjena neurološkog oštećenja

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

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

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

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

Penjanje po zidu bio je anoga kavezom provodilo se tako da je poklopac kavezom postavljen pod kutom od gotovo 90 stupnjeva, a mi-a je postavljen na donju trećinu poklopca. Mi-a se instinkтивno nastoji popeti do vrha, a u prisutству oštećenja, to radi sporije ili krufli po rešetki.

Propriocepција se ispitivala tako da se flivotinja dodirne tupim -tapićem s jedne, a potom i s druge strane tijela. Tipičan odgovor zdrave flivotinje uključujuće je okretanje glave i pokret cijelog tijela prema -tapićem, s ciljem proučavanja i njuskakanja -tapićem. Flivotinja s neurološkim ispadom zanemarivala je jednu stranu tijela, a navedeni odgovor izostajao je na desnoj strani prilikom dodira -tapićem.

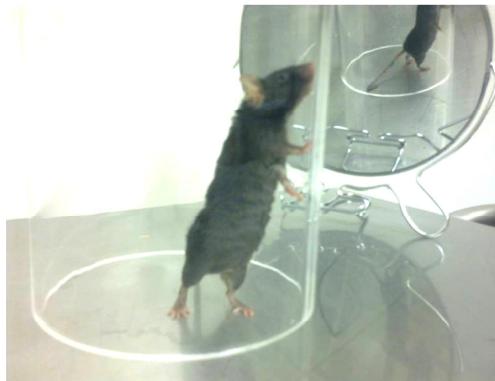
Odgovor na dodir brkova provodio se dodirivanjem brkova na obje strane tupim -tapićem. -Tapićem se pruflao odostraga kako mi-a ne bi video -tapićem, već bi imao isključivo dodirni podražaj. Zdrava flivotinja pomicala je brkove na dodir i okrenula je glavu u smjeru

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

Tablica 6. Procjena neurološkog oštećenja prema Garcii (163)

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

4.7.3. Schallertov cilindar



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

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

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

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

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

Za analizu se koristi ukupni zbroj kretnji te ocjena asimetrije.

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

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

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

Br. flivotinje:	LIJEVI	DESNI	OBA
stjenka			
pod			

4.7.4. Ubrzavajući rotarod

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



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

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

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

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

4.7.5. Obostrani podražaj dodirom (bilateralna taktilna stimulacija)

Obostrani podraflaj dodirom se koristi za mjerjenje jednostranog zanemarivanja i nedostatka detekcije podraflaja dodira na zahva enoj strani (Slika 13) (165).

Mi–je bio stavljen u prazan kavez bez stelje te mu se bila dozvolila 1 minuta za prilagodbe na novi okoli–. Potom je flivotinja bila uzeta u ruku i lagano se bila pri vrstila u –aci drfle i je za nuhalni nabor. Na prednje su –ape s ventralne strane bile stavljene naljepnice dimenzija 127x3 mm. Mi–je potom bio vra en u prazan kavez bez stelje te mu je bilo dozvoljeno da ukloni naljepnice koriste i zube. Mjerilo se vrijeme (latencija) koje je potrebno da prvo kontaktira, te potom i ukloni naljepnicu sa svake –ape i to u 5 poku–aja s 30 sekundi odmora izme u testiranja.



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

Izra unavalo se prosje no vrijeme svakog stimulusa oduzimaju i vrijeme od kontaktiranja naljepnice na jednoj strani do njenog uklanjanja te se za daljnju analizu uzimala prosje na vrijednost 5 testiranja (166).

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

4.8. Histološka analiza tkiva

4.8.1. Priprema tkiva za histološke analize

4.8.1.1. Izolacija mozga za histološke analize

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

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

4.8.1.2. Rezanje na kriostatu

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

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

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

4.8.3. Imunohistokemija

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

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

Odabrana stakalca izvade se iz zamrziva a gdje su stajala pri -20°C i smjeste se u vakuumsku komoru 2 sata na sobnoj temperaturi kako bi tkivo im bolje prionulo uz stakalca. Stakalca se zatim ispiru 3 puta po 5 minuta s otopinom 0,2% Tritona X-100 u fosfatnom puferu (PBS od engl. *phosphate buffer saline*, sastava 13,7 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,65 mM Na₂HPO₄, 0,14 mM KH₂PO₄, pH=7,4, +4°C) kako bi se odstranio višak tekućine za uklapanje. Triton X-100 koristi se za poboljšanje prodiranja protutijela u stanice. Kako bi se spriješilo nespecifično vezanje protutijela uzorci se inkubiraju 60 minuta u 10% kozjem serumu u PBS-u uz dodatak 0,2% Tritona X-100. Kako bi se smanjio volumen korištenih protutijela na stakalcima se prerezi zaokrufe masnom olovkom koja sprječava izljevanje tekućine izvan nacrtanog okvira (Dako Pen, Dako S2002). Uzorci se inkubiraju primarnim protutijelima koja se specifično vezuju za antigene od interesa (Tablica 8.), uz dodatak 2% kozjeg seruma u PBS-u preko noći na +4°C. Ukupni volumen protutijela u otopini koji je korišten po svakom stakalcu je 250 μl.

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

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

Sljede i dan stakalca su se ispirala 5 puta po 5 minuta u PBS-u uz dodatak 0.2% Tritona X-100 te su se potom inkubirala u odgovaraju im sekundarnim protutijelima koja se specifi no veflu za primarna protutijela flivotinja u kojima su generirana (

Tablica 9) 2 sata pri sobnoj temperaturi u mraku. Stakalca se ispiru 5 puta po 5 minuta u PBS-u uz dodatak 0,2% Tritona X100, a zatim 2 puta po 1 minutu u PBS-u. Naposljetku se uzorci prekrivaju sredstvom za o uvanje fluorescencije (Fluorescence Mounting Medium, Dako S3023) i pokrovnicom.

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

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

Za prikaz krvnih filia i aksonogeneze u ipsi- i kontralateralnoj mofldanoj kori kori-teni su rezovi Thy1Tlr2-/- i Thy1 mi-eva, od kojih je 4 mi-a po genotipu tretirano s MCAO, dok su po 3 flivotinje po genotipu predstavljale laflne kontrole.

Obzirom da Thy1 transgeni ni mi-evi konstitutivno izraflavaju fltu fluorescentnu bjelan evinu (*engl. Yellow fluorescent protein, YFP*) i to u dovoljnoj mjeri za njezinu vizualizaciju bez potrebe za protutijelima, rezovi su tretirani samo lektinom iz raj ice za obiljeftavanje krvnih filia.

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

Kako bi se sprije ilo nespecifi no vezanje protutijela uzorci su se inkubirali 60 minuta u 10% kozjem serumu u PBS-u uz dodatak 0,2% Tritona X-100.

Kako bi se smanjio volumen kori-tenih protutijela na stakalcima se prerezi zaokrugle masnom olovkom koja sprje ava izljevanje teku ine izvan nacrtanog okvira (Dako Pen, Dako S2002).

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

Nakon trostrukog ispiranja, dodan je reagens za prikaz staničnih jezgara 4',6-diamidino-2-fenilindol laktat (DAPI) u razredu enju 1/10⁶. U destiliranoj vodi. Ta je otopina s rezova ispirana 2 puta nakon čega je uslijedilo pokrivanje sredstvom za oživanje fluorescencije i pokrovnicom.

4.8.4. Kvalitativna analiza uzorka

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

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

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

Za mjerjenje parametara krvnih filia sastavljena su 2 makro programska slijeda za obradu u Fiji-u te su njima određeni promjeri krvnih filia, broj dodira s okomitom retikulom, površina slike koju prekrivaju file, dok je broj ravniteta određen u odnosu na strane zaslijepljenog ispitivača (Slike 14., 15., 16.).

```

macro "segmentation of blood vessels, DG" {
rename("IMAGE00x.Tif");
run("Invert");
run("Duplicate...", "title=IMAGE 00x-1.Tif");
run("8-bit");
run("Max...", "value=250");
run("Convert to Mask");
run("Gaussian Blur...", "sigma=3");
run("Make Binary");
run("Erode");
rename("temp");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Outlines display
summarize");
}

```

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

```

macro "new segmentation DG" {
rename("IMAGE00x.Tif");
run("Invert");
run("Duplicate...", "title=IMAGE 00x-1.Tif");
run("8-bit");
run("Max...", "value=250");
run("Convert to Mask");
run("Gaussian Blur...", "sigma=3");
run("Make Binary");
run("Erode");
run("Invert");
run("Divide...", "value=255.000");
setMinAndMax(0, 1);
rename("temp");

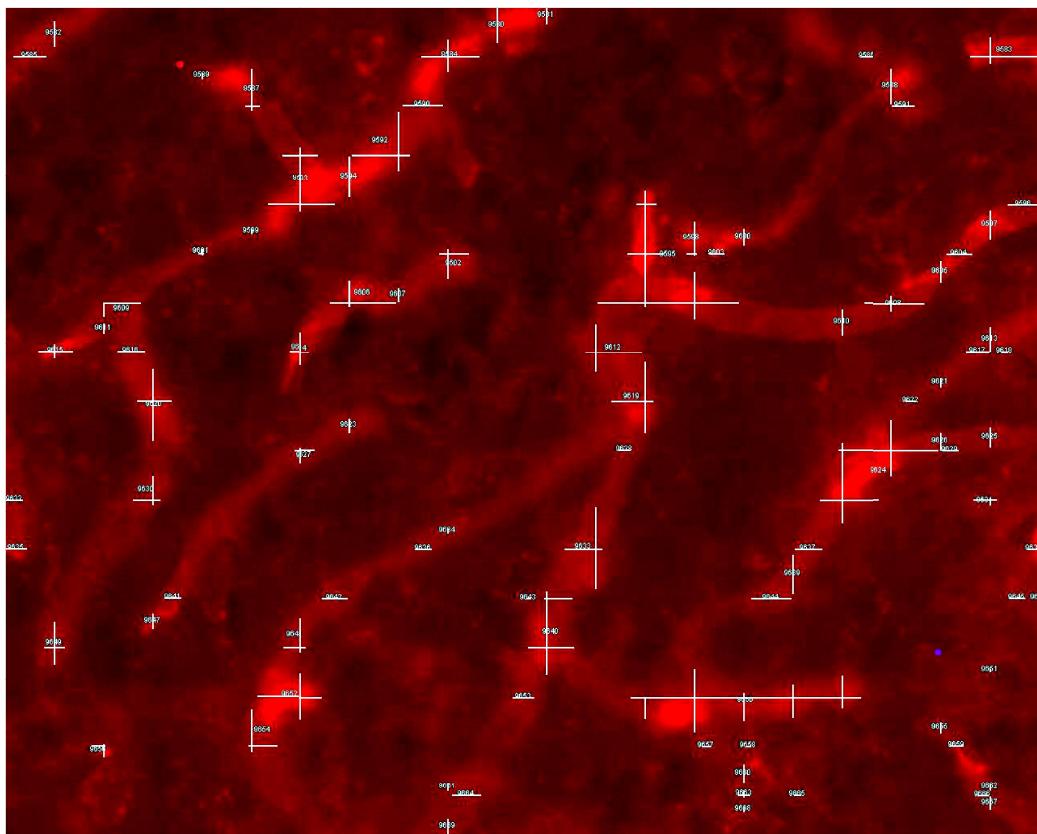
newImage("grid", "8-bit White", 1280, 1024, 1);
selectWindow("grid");
color = "black";
nLines = 20;
width = getWidth;
height = getHeight;
tileWidth = width/(nLines+1);
tileHeight = tileWidth;
xoff=tileWidth;
while (xoff<width) { // draw vertical lines
makeLine(xoff, 0, xoff, height);
run("Fill", "slice");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

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

imageCalculator("Add create", "temp","grid");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
setThreshold(0, 0);
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Outlines
summarize");
imageCalculator("AND create", "IMAGE 00x.Tif","Drawing of Result of temp");
}

```

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



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

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

4.9.1. Izolacija RNA

flivotinje su flrtovane prije MCAO (za vremensku to ku 0 h), 72 sata, tjedan dana i mjesec dana nakon MCAO (po 3 mi-a za skupinu divljeg tipa te 3 za skupinu Tlr2-/ - mi-eva). Mozgovi su izvraeni nakon usmrivanja cervikalnom dislokacijom te su odvojene hemisfere koje su potom naglo smrznute u tekućem dijaku te su se uzorci uvali na -80°C.

Uzorci RNA su pripremljeni iz svake pojedine hemisfere koristeći TRI REAGENT® (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH, USA). U epruvete od 13 ml stavljen je 1 mL trizola i sve je drfljano na led. U svaku epruvetu s trizolom stavljen je uzorak tkiva (50-100 mg). Tkivo je jednolično usitnjeno homogenizatorom u trajanju od 3 minute i potom stavljen na led. Nakon svakog uzorka homogenizator je ispran u vodovodnoj vodi, potom je otopinom za dekontaminaciju RNaseZap® RNase Decontamination

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

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

U sljede em koraku u epruvetice je stavljeno 1 mL 75% etilnog alkohola (koji je napravljen s vodom tretiranom dietilpirokarbonatom, *engl. Diethylpyrocarbonate*, DEPC) te su epruvetice stavljene na centrifugiranje pri 8 000 g / 6 min na 4°C. Nakon centrifugiranja alkohol se izlije, a epruvetice se malo dufle osu–e na papiru kako bi –to vi–e alkohola isparilo. Nakon toga u epruvetice dodano je 60 µL vode tretirane DEPC–om. Sadrflaj u epruveticama lagano je protresen prstom te su epruvetice stavljene na uparavanje kroz 2 minute kako bi preostali alkohol u potpunosti ispario. Nakon uparavanja na ure aju NanoDrop 2000c Spectrophotometer (ThermoScientific) je dobivena izra unata koncentracija RNA u jedinicama µg/µL.

4.9.2. Prepisivanje u cDNA

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

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

- I. DEPC H₂O
- II. Kombinacija (pufer za reverznu transkripciju i smjesa enzima) ó 11 µL
- III. RNA (do ukupne koli ine od 20 µL)

Epruvetice su lagano protresene prstom te se provelo kratkotrajno centrifugiranje za spu–tanje taloga. Epruvetice su stavljene u ure aj za lan anu reakciju polimerazom (Eppendorf Mastercycler) u trajanju od 1h i 5 minuta.

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

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

4.9.3. Kvantitativna reakcija lančane reakcije polimerazom

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

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

Reakcije PCR-a su provedene u triplikatu sa 100 ng cDNA u volumenu reakcijske smjese od 20 1.

Prema uputama proizvo a a za jedan uzorak nanosilo se:

1. 9 µL otopine cDNA (1 µL cDNA + 8 µL DEPC H₂O)
2. 1 µL TaqMan® probe
3. 10 µL TaqMan® glavne smjese

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

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

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

4.10. Western Blot

4.10.1. Izolacija bjelančevina

4.10.1.1. Žrtvovanje životinja za izolaciju bjelančevina

Frivotinje su žrtvovane u vremenskim tokama 0 (kontrola), 3, 7, 14 i 28 dana nakon MCAO. Eutanizirane su cervicalnom dislokacijom te je iz lubanje izoliran mozak. Odijeljeni su komadi i ipsilateralne i kontralateralne mofldane kore u zasebne epruvetice od 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) te su naglo smrznuti u tekućem dušiku i sačuvani na temperaturi od -80°C.

4.10.1.2. Homogenizacija bjelančevina

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

Njihova koncentracija utvrđena je spektrofotometarski u odnosu na slijed BSA rasture koncentracije (0, 0,5 μL, 1 μL, 1,5 μL, 2 μL, 2,5 μL) za određivanje krivulje odnosa absorbancije i koncentracije.

4.10.2. Elektroforeza bjelančevina u gelu

Za elektroforezu se koristio BioRad Mini-PROTEAN® 3 sustav (BioRad®, Hercules, CA, US) s elektroforētornim za pravljenje 15 jaflica i izvorom električnog napona BioRad PowerPac™ Power Supply (BioRad®, Hercules, Kalifornija, USA). Širina prostora za lijevanje gela bila je 1,5 mm.

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

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

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

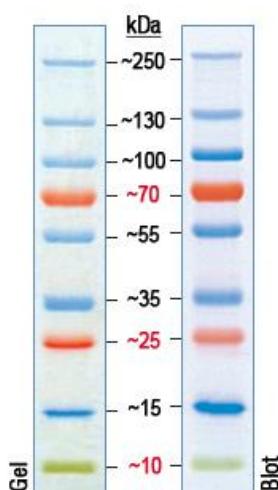
bis-akrilamida, 1,91 mL sterilne vode, 0,75 mL 0,5 M Tris-HCl-a (pH 6,8), 30 μ L 10% SDS-a, 15 μ L 10% APS-a i 6 μ L TEMED-a.

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

Uzorci su se nanosili u jaffice u koli ini od 15 μ g te proporcionalnom koli inom 4X pufera za punjenje bjelan evina.

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

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



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

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

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

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

4.10.3. Transfer bjelančevina s gela na membranu

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

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

za transfer. Sendvi je obuhva en spuštvicama te je smje-ten u pufer za paflljivo izbjegavaju i zarobljene mjeđuri e zraka.

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

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

Sustav je bio okružen ledom radi odrflavanja stalne temperature koja bi u suprotnom rasla i utjecala na bjelan evine. Tako er, rotiraju i magnet u podnošju sustava omogu avao je stalno protjecanje teku ine i tako je sprije eno lokalno zagrijavanje.

Kiselim Ponceau bojenjem provjerena je uspje-nost prijenosa bjelan evina na PVDF membranu. To omogu uje rezanje membrane ne-to nifle od mjesta gdje se prema standardu procjenjuje da je prenesen beta-tubulin (50 kD). Takva 2 dijela membrane mogu se koristiti za zasebno ispitivanje vi-e razli itih bjelan evina.

4.10.4. Obilježavanje primarnim protutijelima

Kako bi se blokirala izloflena mjesta i sprije ilo nespecifi no vezanje protutijela pojedini dijelovi membrana su potom inkubirani 1 sat na sobnoj temperaturi u 5% nemasnom mlijeku u prahu u PBS-Tween puferu.

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

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

Protutijelo	Veličina (kD)	fivotinija podrijetla	Razrije enja	Proizvo a	Katalo-ki broj
DLG4(PSD95) (D27E11) XP®	95	kuni	1/10,000	CellSignaling	3450S
-3-tubulin	55	kuni	1/60,000	CellSignaling	5568S
GAP43	43	mi-	1/10,000	Sigma-Aldrich®	
Sinaptofizin, (Synaptophysin, clone SY38)	38	mi-	1/10,000	Millipore	MAB5258-50UG
CASP3	32	kuni	1/10000	Abcam	ab32351

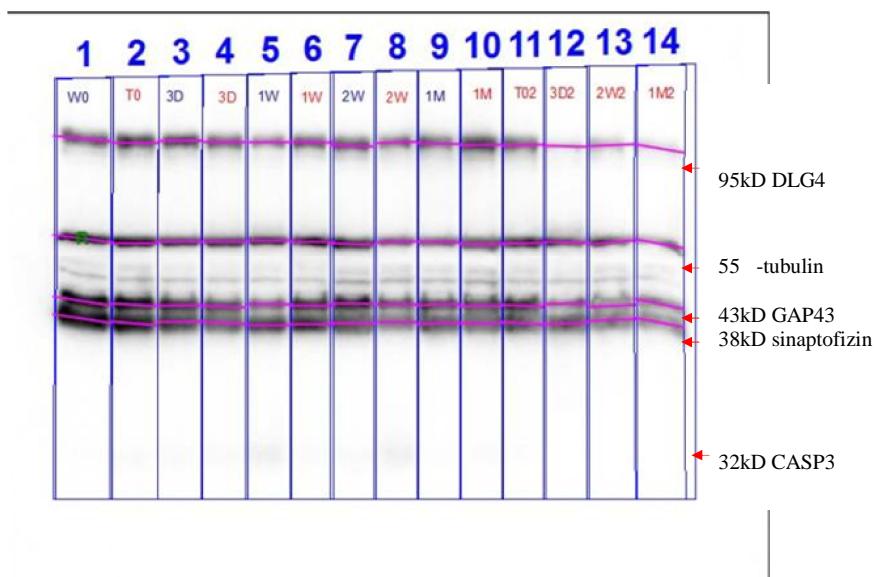
Nakon inkubacije primarnim protutijelom preko no i na temperature od 4°C, membrane se ispiru 4 puta s PBS-Tween puferom u padaju im koncentracijama mlijeka u prahu.

4.10.5. Obilježavanje sekundarnim protutijelima

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

4.10.6. Prikaz signala kemiluminiscencijom

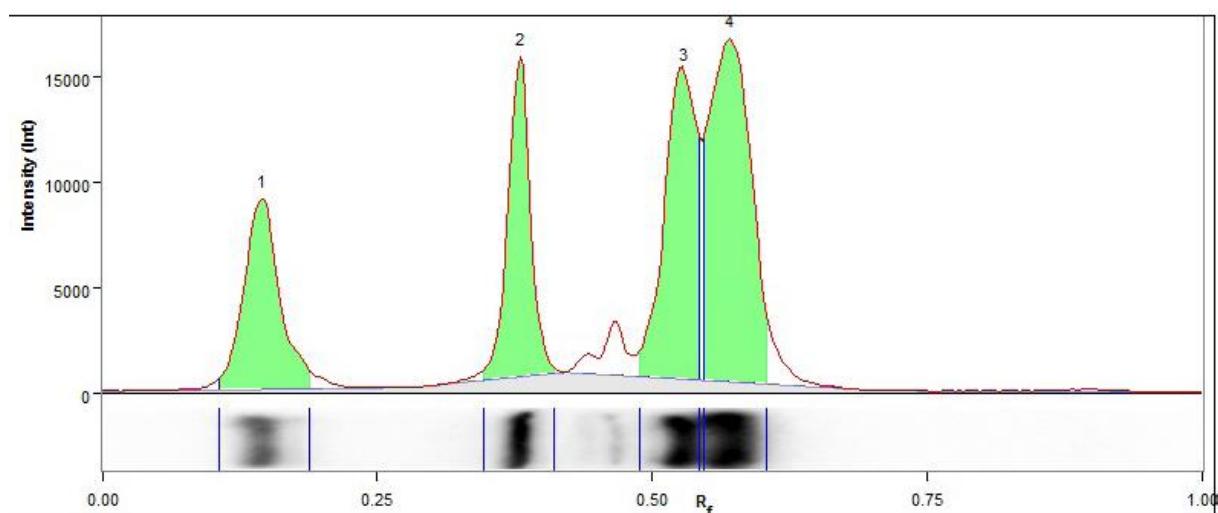
Prikazivanje signala omogu uje kemiluminiscencija koja nastupa uslijed reakcije protutijela i reagensa (Western Lightning ó ECL Enhanced Chemiluminiscence Substrate, PerkinElmer, Waltham, MA, US). Signal se o itava na sustavu ChemiDoc® MP System (Biorad®, Hercules, CA, US) i analizira pomo u softvera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



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

Lane And Band Analysis

Lane 1



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

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

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

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

4.11. In vivo snimanje bioluminiscencije

4.11.1. Linija miševa za snimanje bioluminiscencije

Za selektivno prikazivanje neurona koji istovremeno izraflavaju GAP43 i CASP3 u mozgu flivih mi-eva 1 i 4 dana nakon ishemiske lezije kori-tena je transgeni na mi-ja linija GAP-43/luc/gfp., koja pod promotorom za gen Gap43 sadrži dvostruki bicistronski reporterski sustav: luciferazu (luc) i zelenu fluorescentnu bjelan evinu (engl. green fluorescent protein, gfp) (162). Budu i da crna boja mi-jeg krvna (pigment melanin) apsorbira dio svjetlosnog spektra iznad 600 nm i raspr-uje signal, krvno je uklonjeno električnim brijem aparatom sa područja lubanje, dok bi idealan uzorak predstavljala albino ina ica istog genotipa.

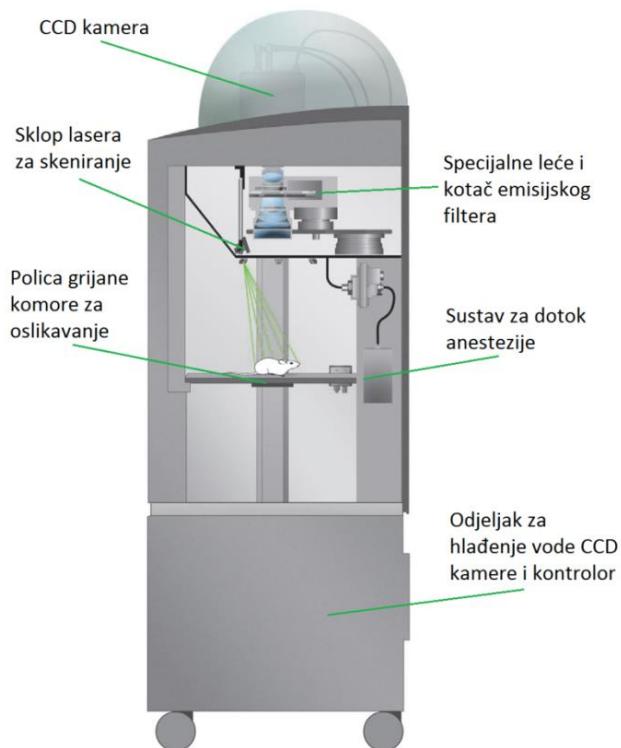
4.11.2. Supstrat za bioluminiscenciju

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

4.11.3. Protokol bioluminiscencije

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

Ukratko, 25 minuta prije samog snimanja mi-eva je intraperitonealno injiciran supstrat VivoGlo® Caspase 3/7 u volumenu 10 µl/g tjelesne težine. Neposredno prije po etika snimanja mi-evi su anestezirani u induksijskoj komori. Mi-evi su potom premješteni u IVIS® 200, gdje su polofleni na grijanu podlogu u potrebu-nom poloflaju, sa njukom u otvoru kroz koji je dotjecao inhalacijski anestetik (2% izofluran u 100% kisiku, 1L/min). 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 zaprimanja informacija o rezoluciji, te visoke osjetljivosti (engl. *high binning*), uz aperturu f/1.



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

4.11.4. Analiza signala bioluminiscencije

Emitirana bioluminiscencija normalizirana je i kvantificirana u jedinicama površinskog zrajenja - fotoni/s/cm²/sr (ukupni broj fotona/sekundi/površini(cm²)/steridijanu). Područje interesa (*engl. region of interest, ROI*), u ovom slučaju 4 x 4 cm, koriten je kako bi se ta vrijednost prima unala i izrazila u obliku broj fotona/sekundi. Navedene vrijednosti izraflene su na način da su stvorene pseudo-bojene slike (crvena i plava su predstavljale najvišu vrijednost intenziteta), koje su potom superponirane crno-bijeloj fotografiji koja je snimljena neposredno prije mjerjenja bioluminiscencije.

4.12. Statistička obrada podataka

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

U usporedbi divljeg tipa (WT) kao kontrole i Tlr2/-/ po vremenskim tokama (izraflaj, bijela evina, testovi ponašanja, analiza krvnih flila i aksona) koriten je 2-strani ANOVA test za ponovljena mjerjenja. Vrijednosti pojedinih skupina po vremenskim tokama uspore ivane su dvostranim T-testom. Radi viestrukihs usporedbi koriten je Bonferronijeva korekcija za multiplicitet.

Prilikom oznaavanja razlika u rezultatima dobivenih kvantitativnim real-time RT-PCR-om, sve statisti koji znaaju razlike su se označavali na grafovima pomoću * označke, no zato su usporedbe apsolutnih vrijednosti po vremenskim tokama za pojedini genotip prikazane odvojeno od usporedbi relativnih vrijednosti izmedju u genotipova.

Razina značnosti na ostalim grafovima izrazila se za sve pojedine analize, a za razinu statisti koji znaaju razlike uzimala se vrijednost od $P \leq 0,05$.

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

Za razlike izmedju tretirane i netretirane skupine istog genotipa korišteni su označci #, ##, ### za WT, odnosno #, ##, ### za Tlr2/-.

Za razlike izmedju kontrola divljeg tipa i Tlr2/- tretiranih s MCAO korišteni su označci i, ii, iii, odnosno i, ii, iii za razlike izmedju kontrola Tlr2/- fliovotinja i WT tretiranih s MCAO (Tablica 12.)

Tablica 12. Označavanje statistički značajnih razlika izmedju pojedinih skupina na grafovima s pojedinim vrijednostima i simbolima za usporedbe pojedinih skupina životinja.⁷

Skupine u usporedbi	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,001$
WT kontrola vs. WT MCAO	#	##	###
Tlr2/- kontrola vs. Tlr2/- MCAO	#	##	###
WT kontrola vs. Tlr2 kontrola	+	++	+++
WT kontrola vs. Tlr2/- MCAO	i	ii	iii
Tlr2 kontrola vs. WT MCAO	i	ii	iii
WT MCAO vs. Tlr2/- MCAO	*	**	***

5. REZULTATI

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

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

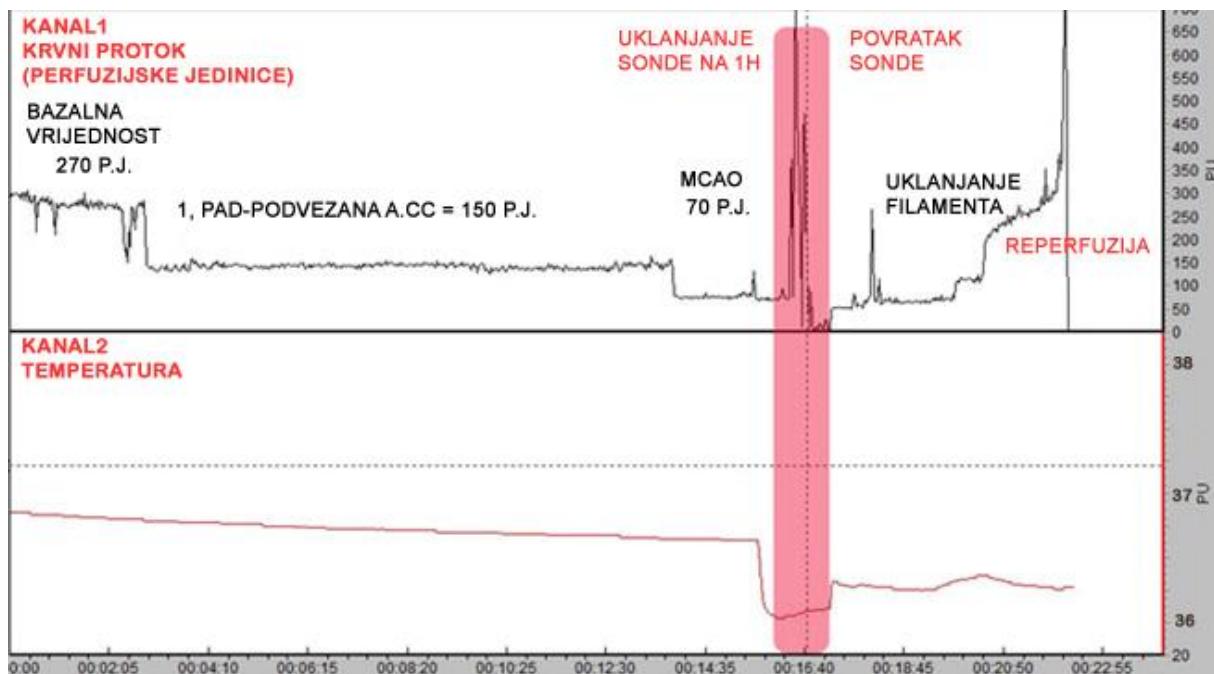
Model ishemije koji se koristio u ovom radu zahtijevao je ujedna avanje veli ine lezije kod vi-e mi-eva, a koju provodi ista osoba, kako je obja-njeno u Uzorcima i postupcima (3.4.3. Izbjegavanje imbenika posredne povezanosti pri MCAO). Potom se pristupilo analizi funkcionalnog oporavka po vremenskim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

5.1. Uspostava i standardizacija mišjeg modela ishemiskog oštećenja

5.1.1. Mjerenje protoka na teritoriju MCA potvrđuje privremenu ishemiju mozga

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

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



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

5.1.2. Metoda MCAO uzrokuje reproducibilno ishemijsko oštećenje mozga

5.1.2.1. Bojanje TTC-om prikazuje prisutnost ishemijskog oštećenja

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

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

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

je nekroti ni nukleus li-en flivih stanica koje uklanjaju detritus ili po inju stvarati glijalni ofiljak.

Bojanje TTC-om pokazalo je prisutnost ishemijske lezije na mozgovima mi-eva koji su potom kori-teni za RT-PCR i Western Blot postupak u akutnoj vremenskoj to ki od 3 dana



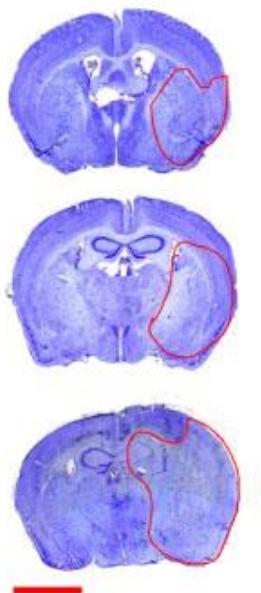
Slika 22. TTC *in vitro* bojanje koronarnih rezova debljine 2 mm 24h nakon MCAO snimljeno optičkim skenerom. Vitalno tkivo obojeno je crvenim produktom dehidrogenacije formazanom, dok je područje ishemijskog oštećenja ostalo neobojeno. Mjerilo 2 mm.

5.1.2.2. Bojanje krezil violetom pokazuje ishemijsko oštećenje standardne veličine

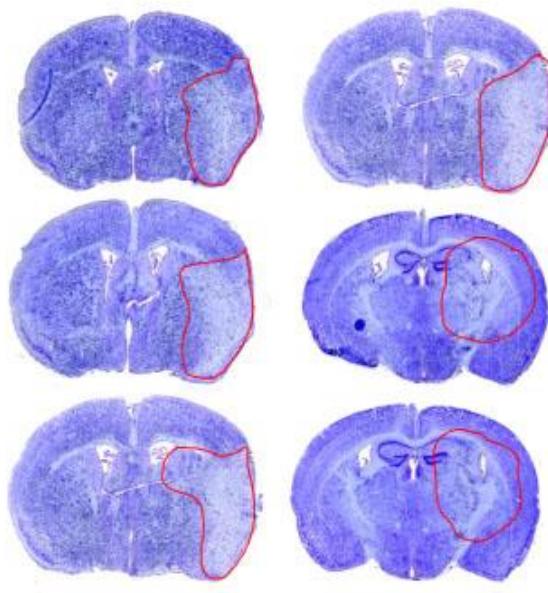
Bojanje krezil violetom sluffi za prikaz i izra unavanje veli ine ishemijskog o-te enja. Izra unavao se izravni volumen ishemijskog o-te enja. Izravni volumen ishemijskog o-te enja predstavlja volumen lezije vidljiv na histolo-kim preparatima kao tkivo ipsilateralne hemisfere koje nije uredne histolo-ke gra e (svjetlige, edematozno tkivo do 3 dana nakon MCAO) (Slika 24). Izravni volumen ishemijskog o-te enja izra unat je tako da je povr-ina lezije (u mm^2) na svakom -estom presjeku kroz mozak umnوفlena 6 puta te umnوفlena debljinom presjeka (35 m). Ishemijska lezija nakon okluzije od 60 minuta obuhva a korteks, hipokampus i striatum ipsilateralne hemisfere, dok se kontralateralna hemisfera prilikom bojanja krezil violetom može koristiti kao kontrola, obzirom da je jednoli no obojena. Segmentaciju ishemijskog tkiva provodi ocjenjiva koji je slijep za genotipove (WT, Tlr2/-) i tretman (lafino operirane flivotinje, flivotinje s MCAO).

Dobivena prosje na vrijednost volumena ishemije nakon 24 sata iznosila je 102 mm^3 ($SD = \pm 33 \text{ mm}^3$) ime je zadovoljen standard prosje nog volumena ishemije izme u $90\text{-}130 \text{ mm}^3$, sa standardnom devijacijom $< 40\%$ (172).

1. dan



4. dan



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

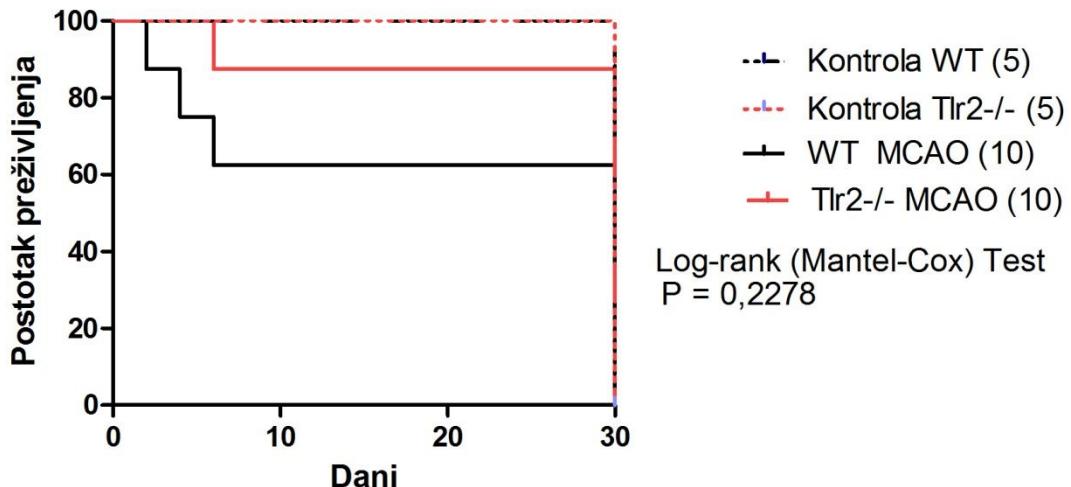
Ranije objavljeni istraživanje dr. Ivana Bohača iz na-ege laboratorija bavilo se određivanjem razlike u veličini izravnog i neizravnog volumena ishemiske lezije kod miševa divljeg tipa i Tlr2-/- i u njemu je zaključeno da se kod miševa s onemogućenim Tlr2 genom ishemiska ozljeda povećava u kasnijim vremenskim tokama nakon MCAO (7 i 14 dana), iako je u ranijoj fazi odgovora na ishemisku leziju (3. dan) volumen lezije manji u odnosu na skupinu miševa divljeg tipa (120). Stoga to nije bio predmet analize ovog doktorata.

5.1.3. Preživljjenje nakon MCAO jednako je kod Tlr2-/- i miševa divljeg tipa

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

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

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



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

5.2. Testovi ponašanja miševa kao mjera funkcionalnog oporavka nakon ishemiskog oštećenja

5.2.1. *Tlr2*-/- miševi nakon MCAO manje gube na tjelesnoj težini u odnosu na miševe divljeg tipa

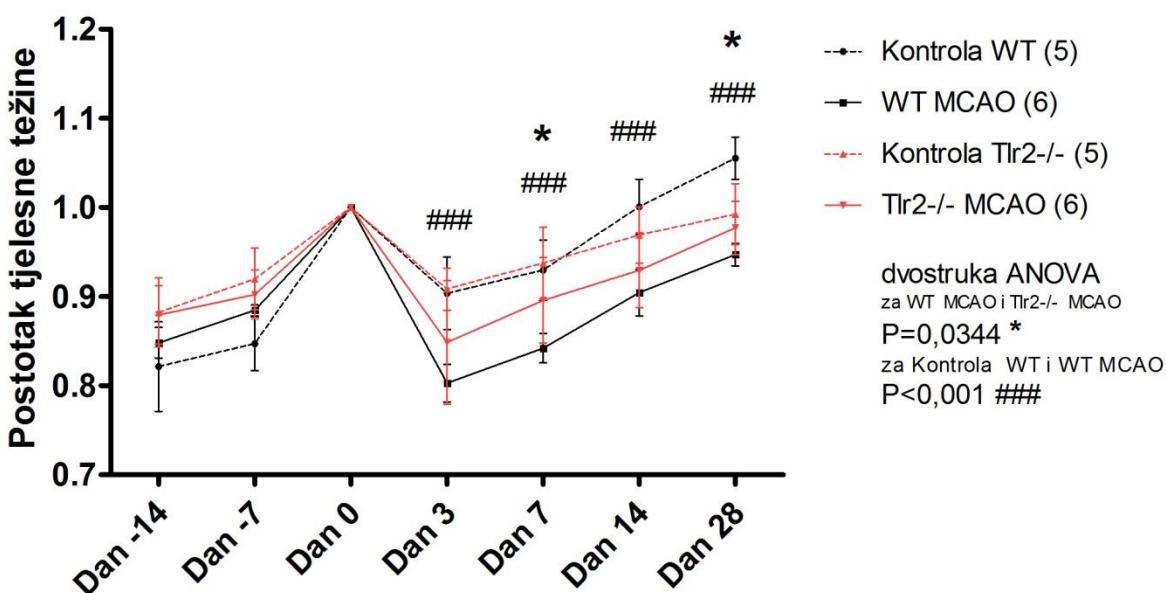
Prosje ne tjelesne tefine miševa u Danu 0 *Tlr2*-/- i WT genotipa zadovoljavale su uvjet normalne raspodjele i nisu se statisti ki zna ajno razlikovale ($24,67\text{g}$, $SD=\pm 2,534\text{g}$ za WT; $24,12 \text{ g}$, $SD=\pm 1,081\text{g}$ za *Tlr2*-/-), te je zornije bilo predo iti kretanje tjelesne tefine po pojedinoj životinji tako da je vrijednost u svakoj vremenskoj to ki prikazana u odnosu na tjelesnu tefinu na dan samog zahvata (Dan 0).

Tijekom oporavka nakon operativnog zahvata bio je o ekivan gubitak tjelesne tefine uslijed opseg stresa uzrokovanih o-te enjem tkiva na vratu kod kontrolnih životinja, odnosno o-te enja tkiva na vratu i ishemije mozga kod MCAO tretiranih životinja (173).

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

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

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



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

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

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

Najmanja tjelesna teflina nakon MCAO cijelo vrijeme nakon zahvata je izmjerena kod divljih tipova s ishemijskim o-te enjem 3 dan, a najve u pak odrflavaju lafno operirani divlji tipovi. Izostanak razlike u tjelesnoj teflini kod Tlr2-/ flivotinja koje su lafno operirane u odnosu na MCAO tretirane Tlr2-/ flivotinje govori u prilog injenici da na njihov po etni gubitak tefline od 3 dana nakon MCAO u najve oj mjeri utje e sam zahvat otvaranja pristupa lijevoj karotidnoj arteriji, a da ishemijsko o-te enje ne doprinosi zna ajno njihovoj kaheksiji.

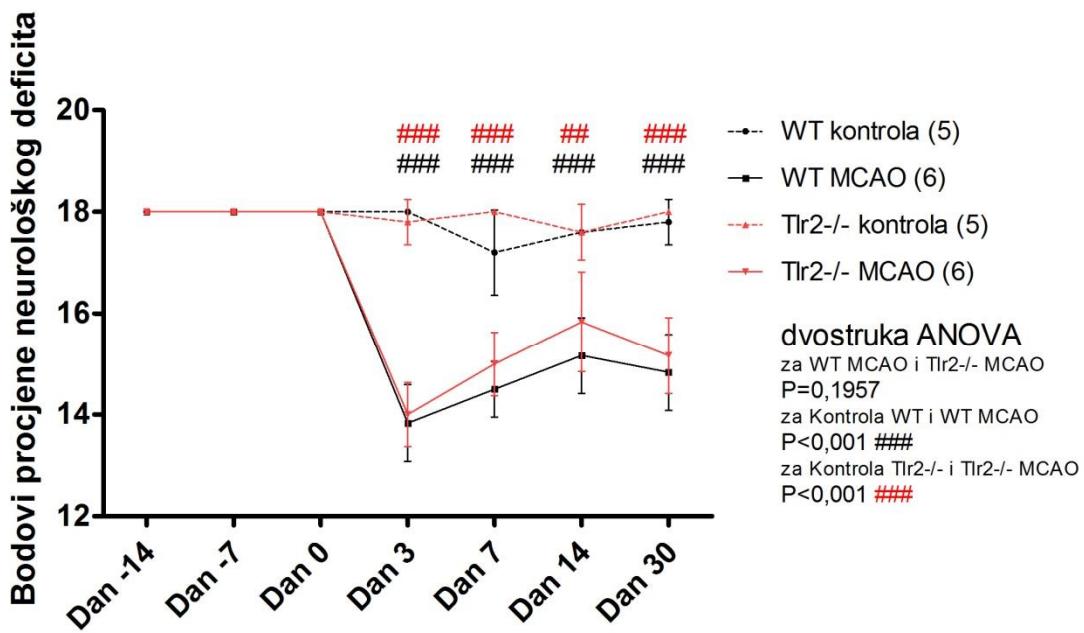
Ishemijsko o-te enje utje e na tjelesnu teflinu smanjenjem sposobnosti flvakanja hrane (-to je svedeno na najmanju mogu u mjeru kori-tenjem mekane hrane u obliku ka-ice prvih 7 dana nakon zahvata, vidi Poglavlje 3.4.5 Postoperativna njega), ali i utjecajem na spontano kretanje, -to je bilo mogu e utvrditi testovima spontanog kretanja kao -to su Schallertov cilindar i Y-labirint.

Pri tom se izmjerena tjelesna teflina mofle odraziti na preostale testove pona-anja, osobito one gdje se promatraju ambulatori parametri (broj dizanja, odrflavanje na rotarodu) stoga je prilikom analize tih rezultata potrebno u obzir ovdje utvr ene razlike..

5.2.2. Neurološko oštećenje nakon MCAO prisutno je kod oba genotipa

Pra enjem neurolo-kog deficitu u dvostrukom ANOVA testu statisti ki zna ajno su identificirani mi-evi koji su podvrgnuti MCAO zahvatu. Njihovi bodovi neurolo-kog deficitu (najvi-e 18) su se znatno smanjili u odnosu na lafno operirane kontrole neovisno o genotipu i to s razinom zna ajnosti $P<0,001$, dok istim testom nije utvr ena razlika izme u Tlr2-/ i WT mi-eva s MCAO ($P=0,1957$) (Slika 26.).

U t-testu između skupina u pojedinoj vremenskoj točki, divlji tipovi s ishemijskim oštećenjem su se u svakoj vremenskoj točki nakon Dana 0 izrazito statistički značajno razlikovali od njih neurološkim stanjem u odnosu na svoje lažno operirane kontrole (Tablica 14). Unutar Tlr2-/- genotipa rezultat se razlikuje samo u točki 14. dana nakon MCAO gdje razina statističke značajnosti tek nije manja ($P=0,0061$), no i dalje ne postoje statistici koji značajno razlike ukoliko se uspore uju skupine WT i Tlr2-/- s MCAO.



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

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

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

Kod svih mi–eva s ishemijskim o–te enjem postoji trend pobolj–anja do 14. dana i potom kratkog zadrflavanja na istoj razini, ili ak opadanja u zavr–noj vremenskoj to ki od 30 dana.

5.2.3. Spontano kretanje i asimetrična uporaba prednjih udova ukazuju na odgodeni nastup oštećenja kod Tlr2/-/ u odnosu na miševe divljeg tipa

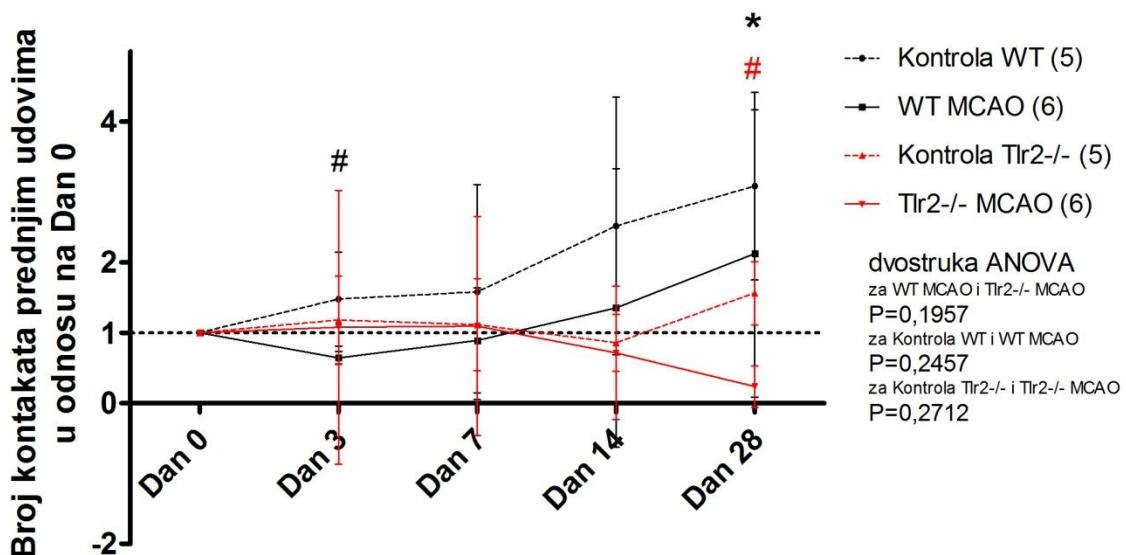
5.2.3.1. Ukupno spontano kretanje u Schallertovom cilindru pokazuje odgodeno oštećenje kod Tlr2/-/ u odnosu na miševe divljeg tipa

Ukupno kretanje u Schallertovom cilindru predstavljalo je zbroj svih kontakata prednjim udovima po stjenci cilindra od lijevanog akrilnog stakla (pleksiglasa) i prilikom povratka na tlo. Mi–evi su bili privikavani na test 2 tjedna prije zahvata, no mjerena kretanja otpo eli su od dana 0.

Ukupni broj kontakata prednjim udovima mi–eva u Danu 0 za po etne vrijednosti Tlr2/-/ i WT genotipa zadovoljavao je uvjet normalne raspodjele i skupine se nisu me usobno statisti ki zna ajno razlikovale ($16,78 \pm 3,94$ za WT; $11,30 \pm 2,47$ za Tlr2/-/), te je zornije bilo predo iti dinamiku ukupnog broja kontakata po pojedinoj flivotinji tako da je vrijednost u svakoj vremenskoj to ki prikazana u odnosu na po etni broj kretanja (Slika 27).

Dvostruka ANOVA za ponovljena mjerena nije ukazala na statisti ki zna ajne razlike izme u pojedinih skupina nakon ishemijskog o–te enja s $P=0,1957$ izme u WT i Tlr2/-/ s MCAO, te $P=0,02457$ izme u skupina divljeg tipa (Kontrola WT i WT s MCAO) i $0,2712$ izme u skupina s onemug enim *Tlr2* genom (Kontrola Tlr2/-/ i Tlr2/-/ s MCAO).

Lafno operirani WT mi–evi kontinuirano postupno pove avaju broj kontakata prednjim udovima, –to zna i da sam zahvat otvaranja pristupa na vratu nije smanjio broj kretnji u odnosu na po etne vrijednosti. Skupina WT mi–eva s ishemijskim o–te enjem zabiljeffila je statisti ki zna ajan po etni pad kretnji 3. dan nakon MCAO ($P=0,0134$, t-test) , –to govori u prilog podlefle oj akutnoj postishemijskoj upali. Potom se postupno oporavljuju i prate trend svojih lafno operiranih kontrola, no nakon mjesec dana ih jo–ne uspjevaju dosti i (Tablica 15.).



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

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

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

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

Tlr2-/- mi-evi s ishemiskim o-te enjem odrflavaju broj kontakata prednjim udovima na po etnoj razini sve do blagog pada 2 tjedna nakon MCAO, a potom se u vremenskoj to ki od mjesec dana po tom parametru statisti ki zna ajno razlikuju od svojih Tlr2-/- lažno operiranih kontrola (s razlikom srednjih vrijednosti od $1,33 \pm 0,23$, 95% IP=od 0,8176 do 1,837, P=0,0002).

U istoj se vremenskoj to ki (Dan 28), poglavito zahvaljuju i naglom padu ukupnog broja kretnji kod Tlr2-/- s MCAO, pojavila i statisti ki zna ajna razlika izme u divljeg tipa i Tlr2-/-

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

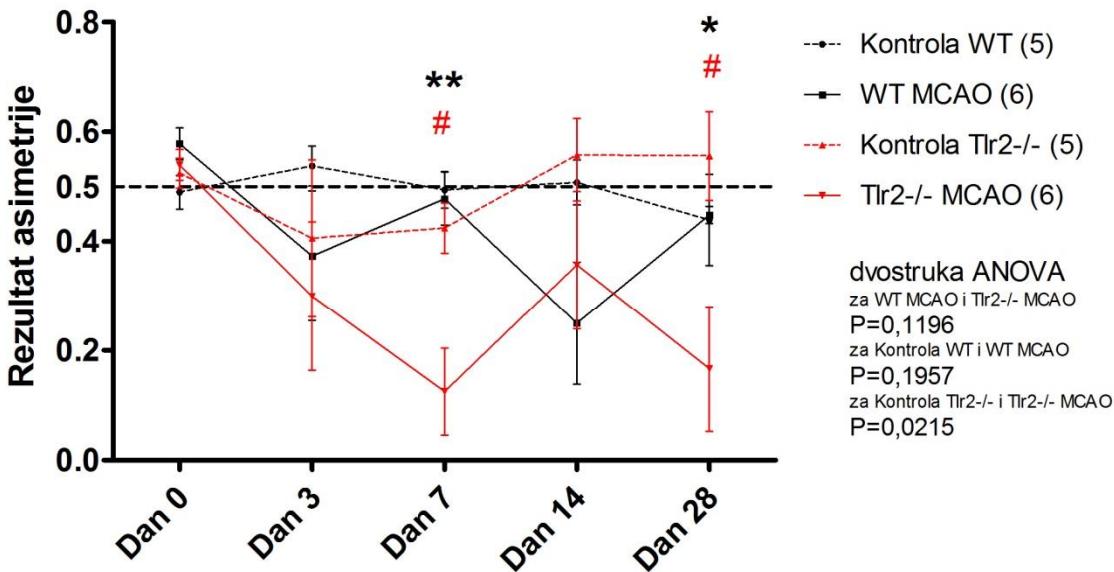
To upu uje na zaklju ak da ishemijsko o-te enje amplificira razlike u ukupnoj koli ini spontanih kretnji izme u divljeg tipa i Tlr2-/- do razine statisti ke zna ajnosti. Pored toga, mi-evi s djelatnim TLR2 (WT) razvijaju akutno motori ko o-te enje s postupnim oporavkom nakon Dana 3, dok mi-evi bez djelatnog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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

U kroni noj fazi uo ljiva je jasna asimetrija kori-tenja udova kod Tlr2/- flivotinja tretiranih s MCAO u odnosu na njihove kontrole istog genotipa, za razliku od mi-eva divljeg tipa kod kojih postoji tendencija asimetri nom kori-tenju prednjih udova kod flivotinja s ishemijskim o-te enjem, ali ona nikada ne prelazi razinu statisti ke zna ajnosti u usporedbi s njihovim lafno operiranim kontrolama.

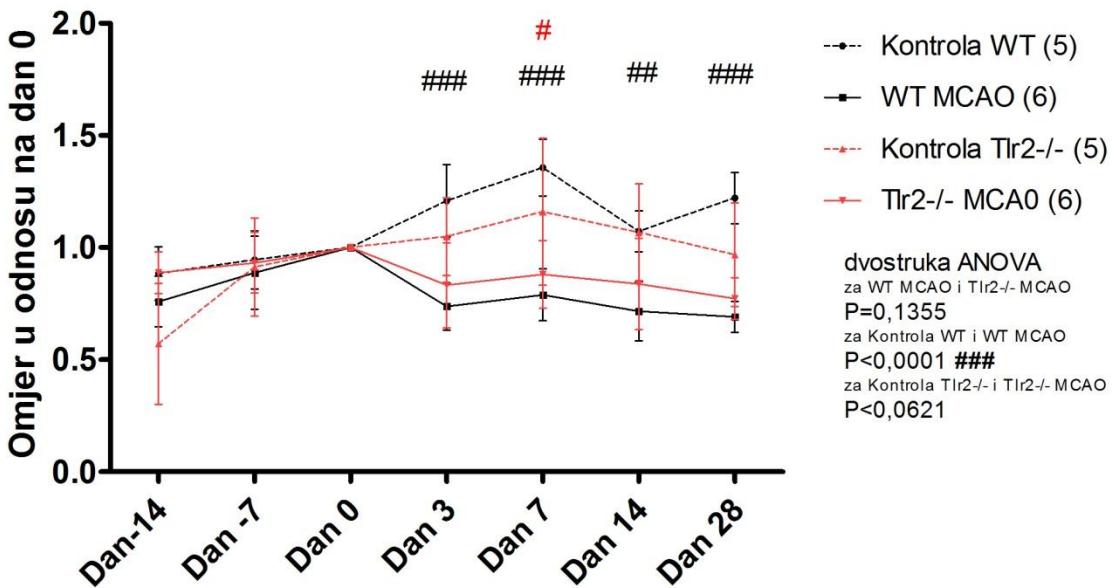
Dok ukupni broj spontanog kretanja pokazuje op u razinu aktivnosti, rezultat asimetrije je specifi an za identifikaciju neurolo-kog simptoma koji je ekvivalent hemiparezi.

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

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

Kontrole divljih tipova nastavljaju napredovati u svojim rezultatima nakon zahvata 3. dan na 121% i 7. dan 136% u odnosu na po etne vrijednosti ustanovljene na Dan 0. Stoga otvaranje pristupa na vratu samo po sebi nije uzrokovalo raniji prekid testa kod divljih tipova. Divlji tipovi s ishemijskim o-te enjem, unato svojoj niskoj tjelesnoj teflini koja im olak-ava kretanje, pokazuju najslabije odrflavanje na rotarodu u odnosu na preostale ispitivane skupine s naglim padom trajanja testa na 74% po etne vrijednosti 3. dan poslije operacije. Potom se njihov prosje ni rezultat pobolj-ava (78%) i stabilizira na 70% vlastitih po etnih vrijednosti iz Dana 0 (Slika 30., Tablica 17.).

No, analize unutar vremenskih to aka su pokazale kako se 7 dana nakon MCAO rezultat asimetrije statisti ki zna ajno razlikovao izme u divljeg tipa i Tlr2/- s MCAO s izraflenjom asimetrijom uporabe prednjih udova kod mi-eva bez TLR2 (srednja razlika -0,35, 95% IP= od 0,15 do 0,56, P=0,0034). Istovremeno se javlja i statisti ki zna ajna razlika izme u skupina Tlr2/- genotipa, gdje Tlr2/- mi-evi s MCAO rezultatom od 0,125 zna ajno odstupaju od normalne vrijednosti od 0,5 i vrijednosti svojih lafno operiranih kontrola (P=0,0218). Potom 14. dana ta razlika nakratko nestaje da bi se opet pojavila 28. dana nakon MCAO. Tad se Tlr2/- mi-evi s MCAO statisti ki zna ajno razlikuju slabijim kori-tenjem kontralateralnog uda prikazano rezultatom asimetrije i od svojih lafno operiranih kontrola (P=0,037) i od WT mi-eva s MCAO (P=0,0343). Divlji tipovi ne pokazuju razliku u rezultatu asimetrije nakon MCAO u odnosu na svoje lafno operirane kontrole ni u jednoj vremenskoj to ki (Slika 29).



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

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

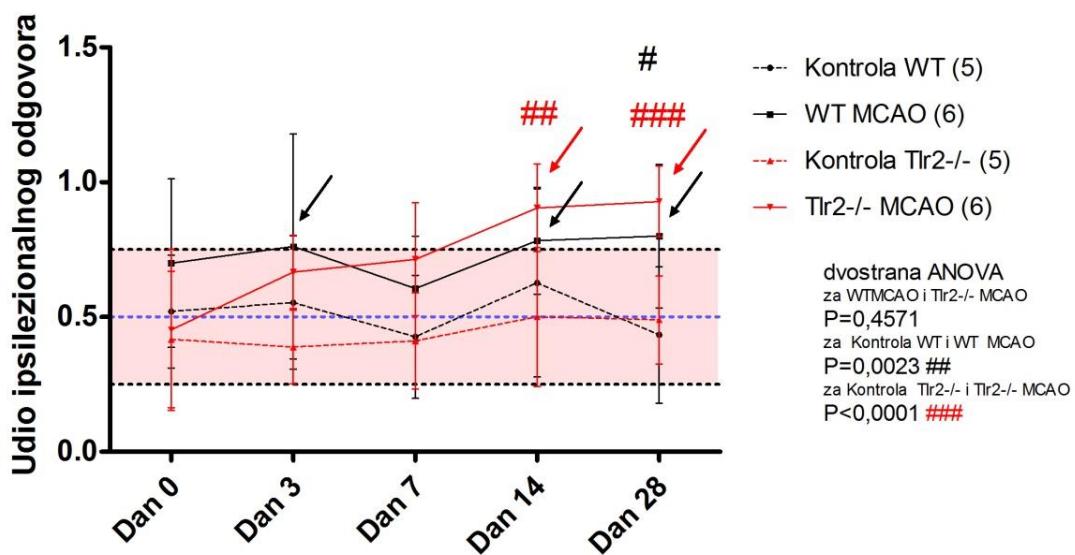
Vrijeme	Kontrola WT (5)	WT MCAO (6)	P za WT	Kontrola Tlr2-/- (5)	Tlr2-/- (6)	P za Tlr2-/-	P za WT MCAO vs Tlr2-/- MCAO
Dan -14	0,884± 0,048	0,759± 0,046		0,570± 0,121	0,888± 0,038		
Dan -7	0,945± 0,053	0,888± 0,066		0,913± 0,098	0,932± 0,056		
Dan 0	1	1		1	1		
Dan 3	1,208± 0,066	0,737± 0,043	0,0001	1,049±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

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

operirani mi-evi Tlr2^{-/-} genotipa sporije oporavljaju od zahvata u odnosu na svoje lafno operirane kontrole divljeg tipa, no bez identificirane statistički značajne razlike. To ukazuje na znatno opterećenje samog zahvata, sa i bez ishemije, na sposobnost flivotinja Tlr2^{-/-} genotipa da se održavaju na rotarodu, dok je kod flivotinja divljeg tipa utjecaj ishemiskog dočekivanja onaj koji je presudan za performanse na rotarodu. Ishemijsko dočekivanje samo po sebi slabije pogodjuje Tlr2^{-/-} mi-eve u pogledu održavanja na ubrzavajućem rotarodu, te se zna da je to isto tako i za 7. dan – to je odgovor u odnosu na mi-eve divljeg tipa koji se zna da je lošiji održavanje u testu već 3. dan nakon MCAO. Tlr2^{-/-} mi-evi s MCAO su u svakoj vremenskoj točki postizali bolje rezultate od svojih kontrola divljeg tipa s MCAO, no nije u jednom trenutku ta razlika nije statistički značajna.

5.2.5. Poremećaj osjeta dodira ima blaži nastup, a zadržava se dulje kod Tlr2^{-/-} u odnosu na miševe divljeg tipa

U testu obostranog podražaja dodirom pokazalo se kako se pojedine vrijednosti za udio preferirane reakcije na podražaj lijeve prednje ruke (ipsilezionalni stimulus) kreću između 38% kod Tlr2^{-/-}, odnosno 64% kod WT mi-eva (ukupna prosjeka na vrijednost 51%), sa standardnom devijacijom od približno 25% (25,8% za Tlr2^{-/-}; 27,8 za WT).



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

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

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

Dvostranim ANOVA testom za ponovljena mjerjenja statisti ki izrazito zna ajna razlika pokazala se samo pri usporedbi Tlr2/- mi-eva s MCAO i njihovim lafno operiranim kontrolama ($P<0,0001$), dok takva razlika nije na ena izme u skupina divljev tipa ($P=0,0023$), niti u usporedbi WT i Tlr2/- mi-eva s MCAO ($P=0,4571$).

Kontrolne skupine lafno operiranih mi-eva za oba genotipa ni u jednoj vremenskoj to ki nisu prelazile raspon standardne devijacije od 25% do 75%. Kako bi se pojedini rezultat razmatrao kao statisti ki zna ajno razli it, on prvo mora prelaziti navedene granice, a tek ga se potom uspore ivalo s prosje nom vrijednosti i varijancom kontrolne skupine.

Skupina WT mi-eva s MCAO je 3. dan nakon zahvata prosje nom vrijednosti testa od 76,2% pre-la rub zone SD-a (od 25% do 75%). Potom je u subakutnoj vremenskoj to ki od 7. dana rezultat nakratko u-ao u normalni raspon sa 60,6% da bi ponovno porastao u kroni nim vremenskim to kama od 14. dana na 78,3% i 80% 28. dana nakon zahvata (Slika 38, Tablica 18.). Obzirom na varijancu kontrolne skupine, WT s MCAO se statisti ki zna ajno razlikuju od lafno operiranih WT mi-eva samo 28. dana s prosje nom razlikom od 37% (95% IP= 72% do 9,8%, $P=0,0452$).

Kod Tlr2/- mi-eva s MCAO akutna reakcija 3. dana nije bila tako izrazita kao kod divljev tipa, te je sa 66,7% ostala unutar zone SD-a. Sedmi dan je nastupilo blago pove anje na 71,4%, da bi tek u kroni nim vremenskim to kama iza-la iz zone SD-a sa 90,5% 14. dana i 92,8% 28. dana, te pri tom u oba slu aja prema-ila vrijednosti divljih tipova s MCAO.

U iste se dvije vremenske to ke ta skupina statisti ki zna ajno razlikovala od svojih lafno operiranih kontrola Tlr2/- genotipa tako da je udio ipsilezionalnog odgovora bio u prosjeku

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

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

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

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

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

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

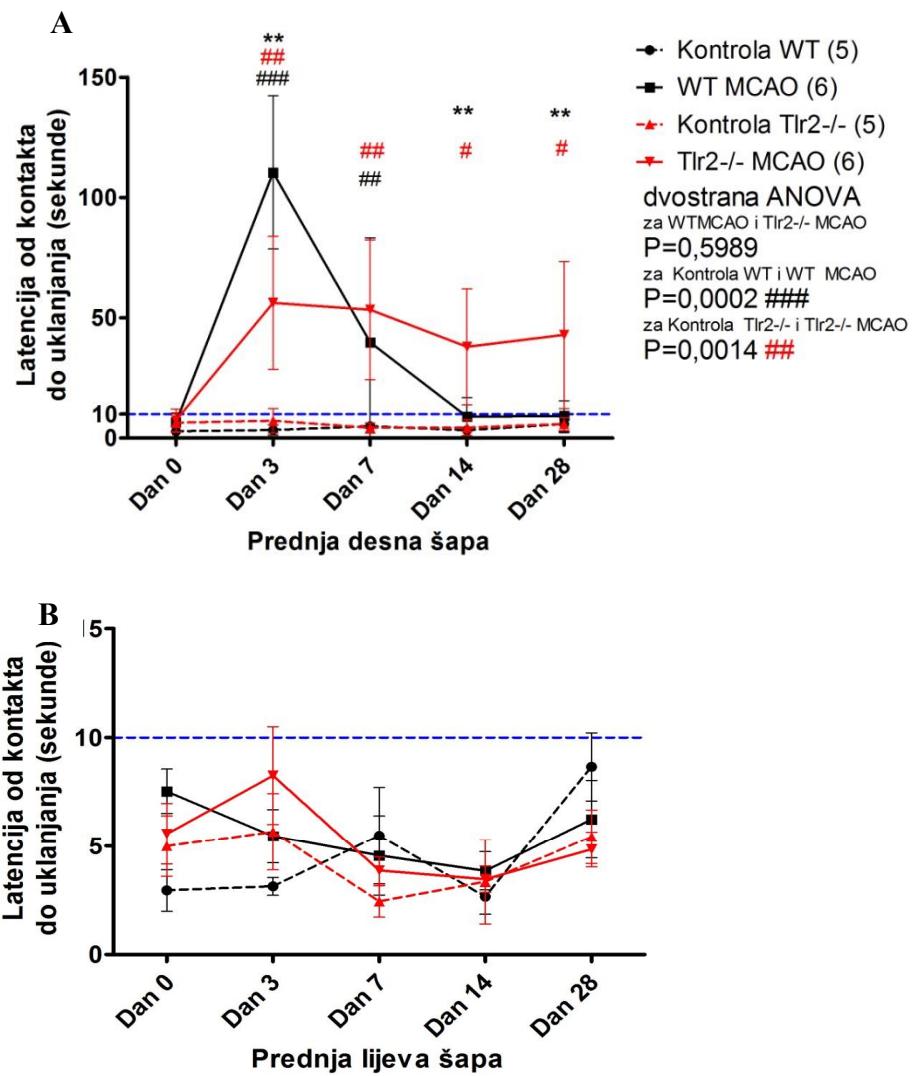
U subakutnoj vremenskoj to ki od 7 dana kod skupine WT s MCAO uo en je pad latencije u odnosu na prethodno mjereno, no ona je jo- uvijek statisti ki zna ajno dulja u odnosu na lafno operirane kontrole i to u prosjeku za 34,93 sekunde (95%IP= -0.27" do 70,1", <0,01).

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

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

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

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



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

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

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

Obzirom da WT MCAO skupina nakon akutnog porasta smanjuje latenciju, dok ona kod Tlr2-/- MCAO skupine raste blafle, ali se ne vidi na vrijednosti kontrola ni u kroni noj vremenskoj točki, uočene su statistički značajne razlike između tih flivotinja u vidu dulje latencije kod Tlr2-/- MCAO miševa u prosjeku za 29 sekundi (95% IP=-4,5" do 62,6", P<0,05) 14. dana, odnosno 33,7 sekundi (95% IP=0,14 do 67,2", P<0,01) 28. dana.

Takvi rezultati govore u prilog slabijem po etnom očete enju osjeta dodira, no njegovom duljem perzistiranju bez TLR2, uključujući i detektirano pogorjanje u kroni noj fazi mjesec dana nakon ishemije.

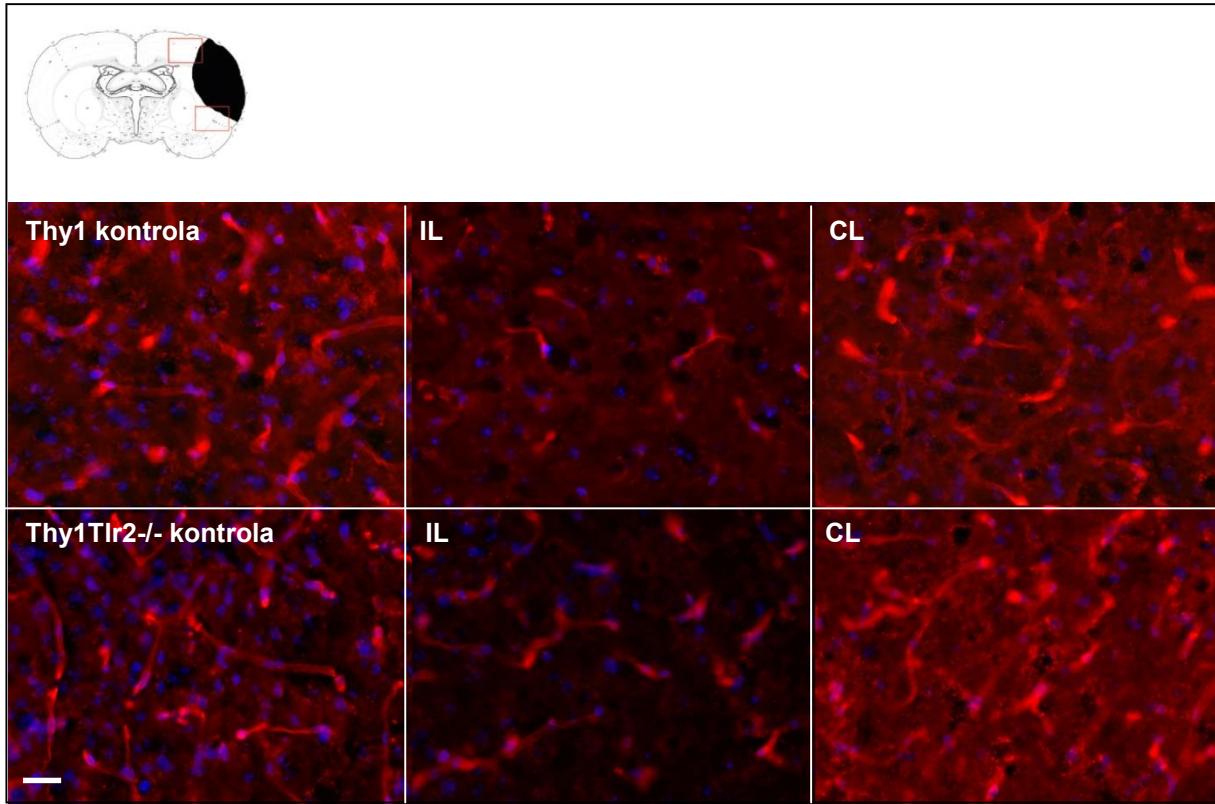
Promatrajući lijevu prednju nogu koja je ipsilezionalni i te je inervirana zdravim kontralateralnim korteksom, ne nalazi se statistički značajnih razlika i vremena latencije ostaju unutar prosjeka po etnih 10 sekundi (Slika 32.B).

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

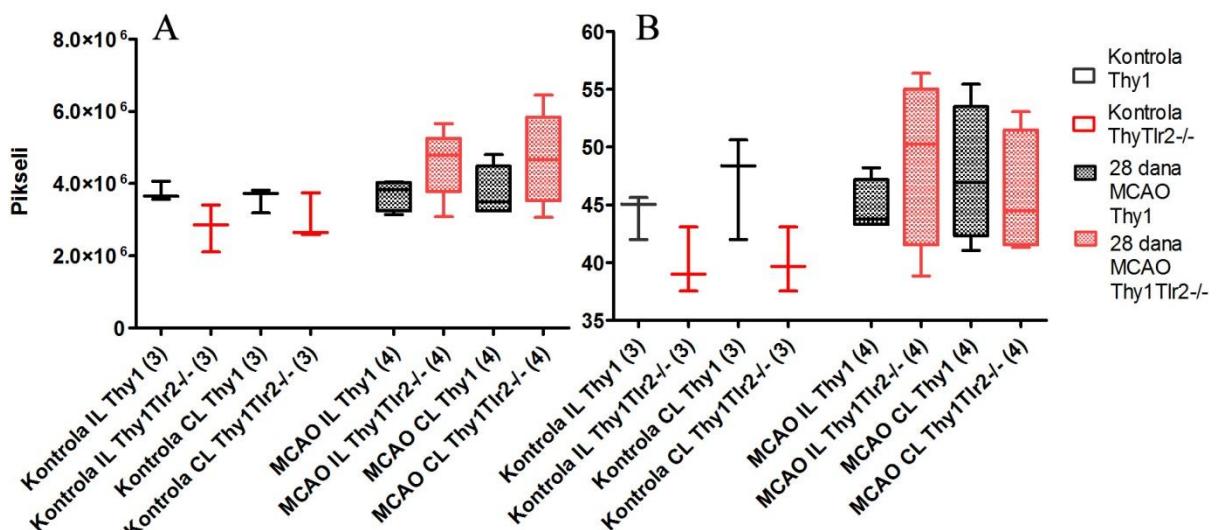
Obzirom da je izraflaj TLR2 induciran u endotelnim stanicama u uvjetima upale, pristupilo se analizi krvnih filala močvarne kore (102). Za mjerjenje utjecaja nedostatka TLR2 u uspostavljanju funkcionalne i zrele mikrocirkulacije nakon ishemijskog očete enja u perilezionalnom području odabrana je krona vremenska točka od 28 dana nakon MCAO (174).

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

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



Slika 32. Reprezentativne mikrofotografije fluorescentnog bojenja s lektinom rajčice (DyLight® Tomato Lectin), bojom za krvne žile (crveno) i DAPI, bojom za stanične jezgre (plavo) kod lažno operiranih kontrola za Thy1 (Thy1 kontrola) i Thy1Tlr2-/ miševe (Thy1Tlr2-/ kontrola), te njihove odgovarajuće ipsilateralne (IL) i kontralateralne (CL) hemisfere mjesec dana nakon MCAO. Crveni pravokutnici na shematskom prikazu označavaju perilezionalni kortex koji je uz homotopni kontralateralni kortex predstavlja područje analize. Mjerilo 50 μ m.



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

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

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

Prosječan broj granjanja krvnih filila (birufkacija) po vidnom polju je kod Thy1 ukupno za obje hemisfere iznosio je $14,10$ ($SD = \pm 1,813$), odnosno $16,46$ ($SD = \pm 2,4$) kod Thy1Tlr2-/- mi-eva te nisu postojale statisti ki značajne razlike po etnog stanja uspoređivano dvostranim t-testom za nezavisne uzroke ($P=0,0592$) (Slika 34., Tablica 21.).

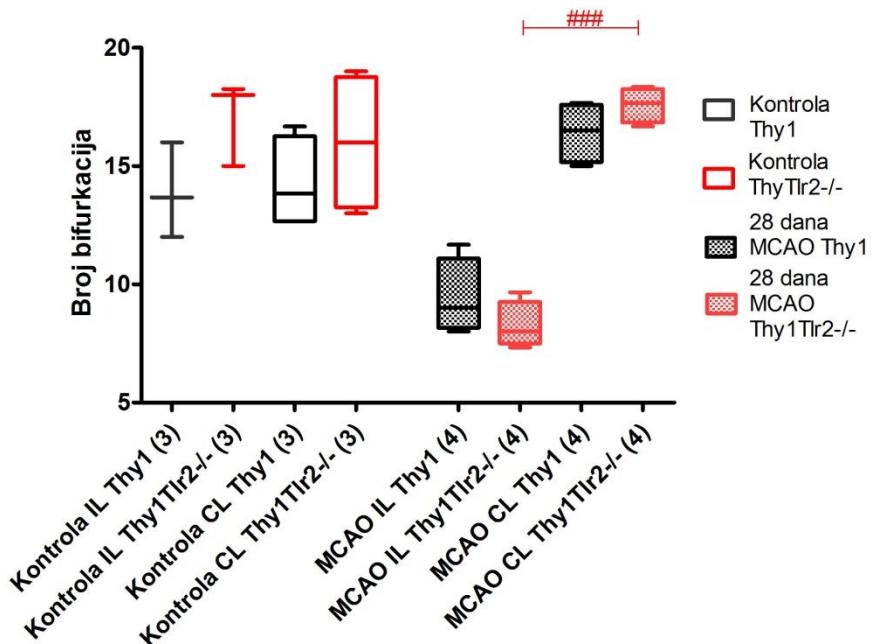
Dalnjom analizom broja bifurkacija t-testom za uzroke nije raspodjela nije parametrijska (Mann-Whitney) pokazalo se da ne postoje statisti ki značajne razlike u po etnim vrijednostima između lijeve i desne hemisfere kod Thy1 filotinija koje su divljeg tipa po pitanju ekspresije TLR2 (Thy1), ni kod Thy1Tlr2-/-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

U skupini Thy1 mi-eva s MCAO mjesec dana nakon ishemije broj bifurkacija se smanjio u ipsilateralnoj hemisferi te je iznosio $9,4$ ($SD = \pm 2,31$), dok je u kontralateralnoj hemisferi lagano porastao na $16,42$ ($SD = \pm 3$). T-testom za vezane uzorce utvrđena je statisti ki značajna razlika obliku smanjenog broja bifurkacija zahvaljujući hemisferu u odnosu na nezahvalu enu kod Thy1 mi-eva mjesec dana nakon MCAO ($P=0,0129$).

Thy1Tlr2-/- mi-evi s MCAO su u istoj vremenskoj točki imali izraženiji pad broja bifurkacija u hemisferi zahvaljujući ishemijom na prosječnu vrijednost od $8,25$ ($SD = \pm 1,2$).

Kontralateralna (desna) hemisfera je pokazala lagani porast broja bifurkacija s prosjekom od 17,6 ($SD=\pm 1,75$), sličan reakciji kontralateralne hemisfere kod WT skupine. Zahvaljujući i tom kontralateralnom porastu, a ipsilateranom pada broja bifurkacija kod Thy1^{-/-} miševa postoji statistički značajno manji broj bifurkacija u ipsilateralnom kortexu u odnosu na kontralateralni s prosječnom razlikom od 9,33 (95% IP= od 8,034 do 10,63, $P<0,0002$).

Uzimajući i u obzir Bonferronijevu korekciju za multiplicitet, u ovom se testu samo ta razlika pokazala kao statistički značajna.



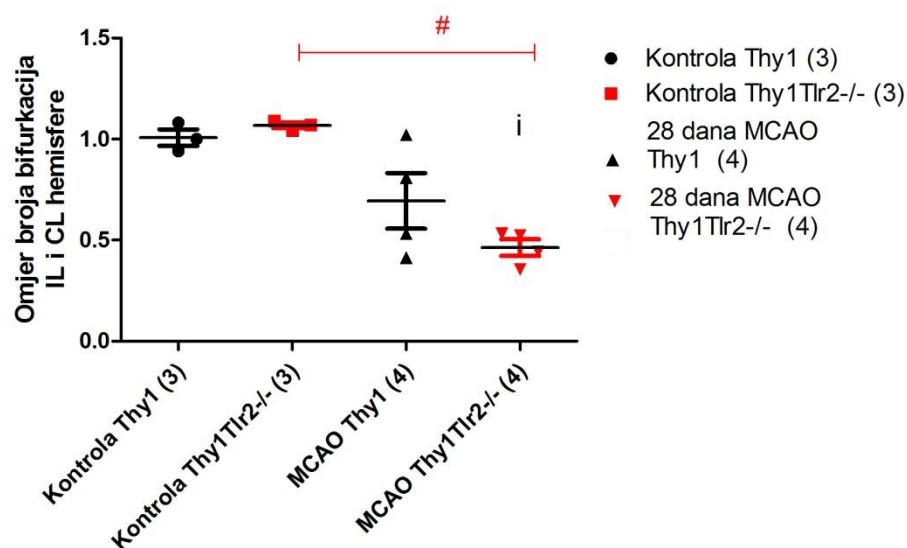
Slika 34. Broj bifurkacija krvnih žila u kori mozga kontrolnih miševa bez ishemije (Kontrola IL Thy1 i Kontrola IL Thy1Tlr2-/-, Kontrola CL Thy1 i Kontrola CL Thy1Tlr2-/-) te ipsilezionalnih (MCAO IL Thy1, MCAO IL Thy1Tlr2-/-) i kontralezionalnih kora mozga (MCAO CL Thy1, MCAO CL Thy1Tlr2-/-) 28 dana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

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

Broj bifurkacija	Thy1			Thy1Tlr2-/-			Thy1 vs Thy1Tlr2-/-
			P IL28 / CL28		P s IL0	P IL28 / CL28	
Kontrola IL	$13,89 \pm 1,160$	1 / CL28		$17,08 \pm 1,044$	0,8845		0,2
Kontrola CL	$14,25 \pm 0,9754$			$16 \pm 1,472$			0,3094
MCAO IL	$9,417 \pm 0,7979$	0,0571 / 0,0129		$8,250 \pm 0,4977$	0,0571	0,0002	0,2610
MCAO CL	$16,42 \pm 0,6437$			$17,58 \pm 0,3696$			0,1671

Stavljanjem u omjer prosječni broj bifurkacija u ipsilateralnoj hemisferi s prosječnim brojem bifurkacija u kontralateralnoj hemisferi istog mješeva, pokazalo se kako je vrijednost prosječnog omjera broja bifurkacija mjesec dana nakon MCAO nizka i kod Thy1 i kod Tlr2-/-. Flivotinja u odnosu na njihove kontrole skupine (Kontrola Thy1, Kontrola Thy1Tlr2-/-) (Slika 35., Tablica 22.).

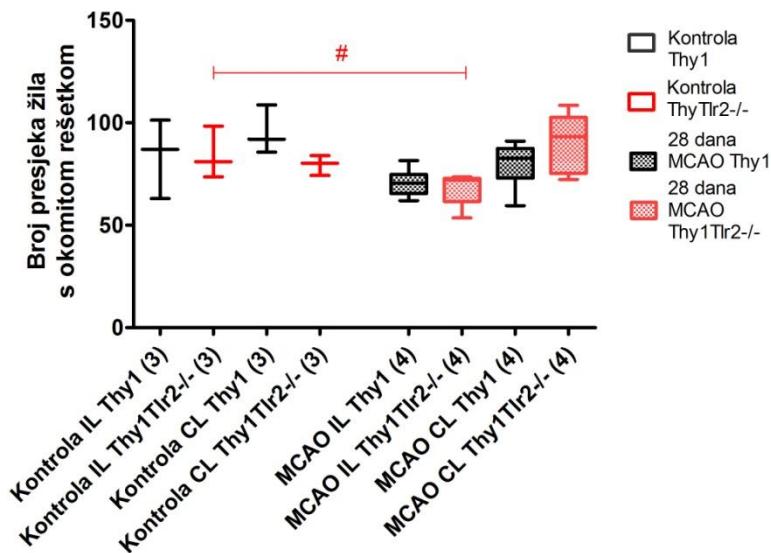
Zahvaljujući i ipsilateralnom padu, a kontralateralnom porastu broja bifurkacija, njihov omjer je mjesec dana nakon MCAO kod Thy1 mješeva u prosjeku iznosio 69% ($SD=\pm 27\%$), odnosno 46% ($SD=\pm 8\%$) kod Thy1Tlr2-/- mješeva. K tome je taj omjer kod Thy1Tlr2-/- skupine statistički značajno niži od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



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

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

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



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

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

Broj presjeka	Thy1			Thy1Tlr2-/-			Thy1 vs Thy1Tlr2-/-
		P s IL 0	P IL28 / CL28		P s IL0	P IL28 / CL28	
Kontrola IL	83,75± 8,067			84,33± 7,313			1
Kontrola CL	95,44± 6,859	0,7871		79,53± 2,814	0,5		0,1
MCAO IL	70,80± 2,423	0,3833		68,18± 3,723	<u>0,0357</u>		0,5511
MCAO CL	79,92± 4,493	0,3240	0,2316	89,82± 6,513	1	0,0911	0,2304

Promatrajući broj presjeka krvnih žila i okomite rešetke dobiven je pokazatelj izvijuganosti krvne mreže koja posredno opisuje angiogenezu i sazrijevanje, obzirom da su mlađe krvne žile većeg faktora izvijuganosti (Slika 36., Tablica 23.).

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

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

Kod Thy1 divljeg tipa za *Tlr2* postoji statisti ki zna ajno manji broj presjeka u ipsilateralnoj hemisferi nakon mjesec dana u usporedbi s kontrolom. Prosje no je iznosio $70,80 \pm 2,423$.

Broj presjeka za Thy1Tlr2-/- mi-eve je mjesec dana nakon ishemije u ipsilateralnoj hemisferi iznosio $68,18 \pm 3,723$, je tako er bio statisti ki zna ajno smanjen u odnosu na kontrolu.

Prilikom usporedbe kontralateralne i ipsilateralne hemisfere mjesec dana nakon ishemije ne postoji statisti ki zna ajna razlika za oba genotipa.

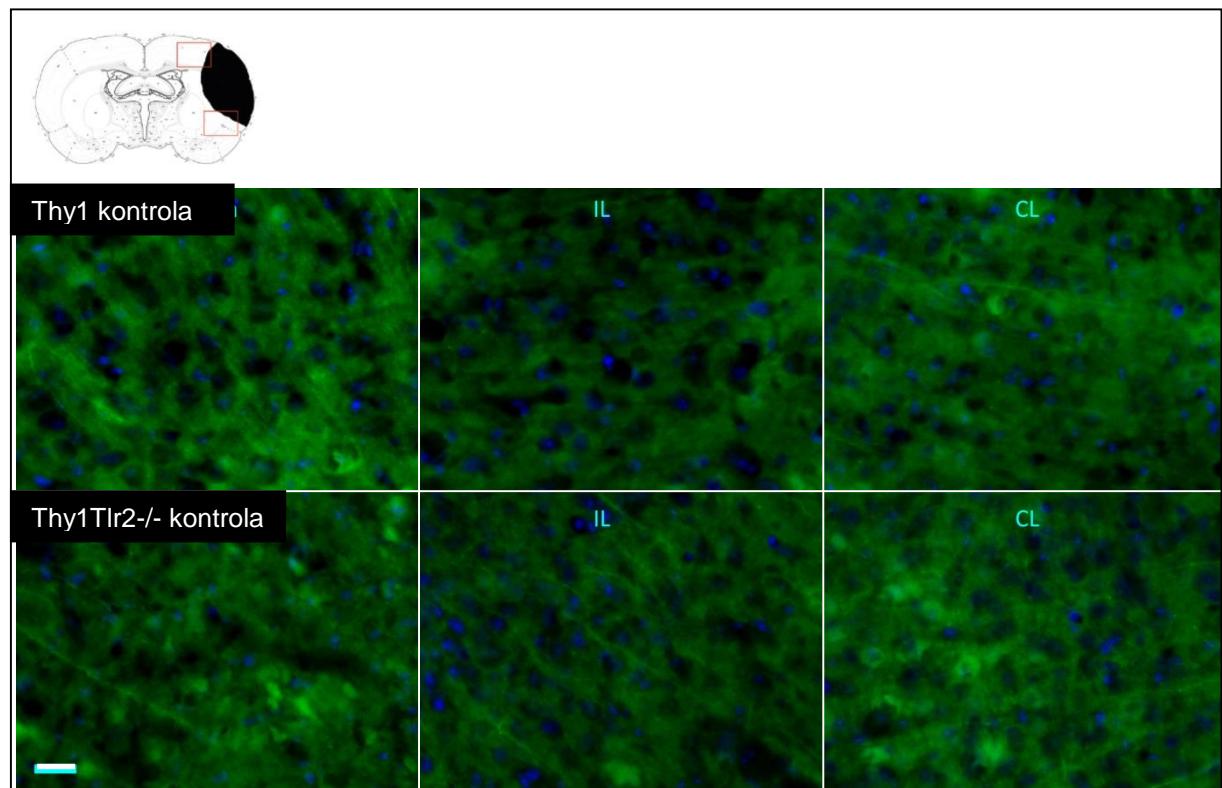
Kontralateralne hemisfere su odrflale svoj broj presjeka i mjesec dana nakon ishemije kod oba genotipa.

Takav rezultat ukazuje na smanjenje izvijuganosti krvnih flila nakon ishemije kod mi-eva koji ne posjeduju TLR2. Kako je izvijuganost pokazatelj novih krvnih flila, te obzirom da je broj bifurkacija kod Thy1Tlr2-/- mi-eva manji, mogu e je zaklju iti kako su kod mi-eva koji posjeduju TLR2 nakon mjesec dana file ve sazrele i razgranale se, dok se kod flivotinja kojima nedostaje TLR2 taj proces sporije odvija.

5.4.Izrazitija asimetrija neuralne mreže mjesec dana nakon MCAO kod Tlr2-/ u odnosu na miševe divljeg tipa

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

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

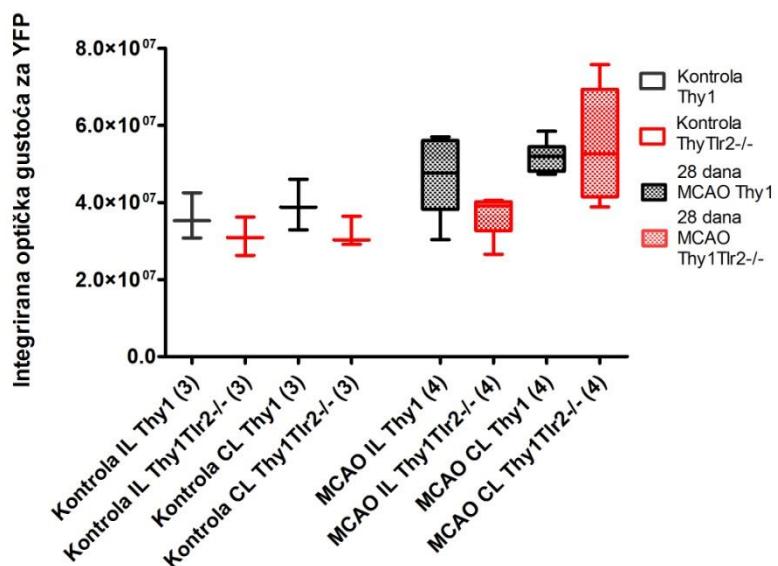


Slika 37. Reprezentativne mikrofotografije fluorescencije žute fluorescentne bjelančevine (YFP, zeleno) i DAPI bojanja staničnih jezgara (plavo), kod lažno operiranih kontrola za Thy1 (Thy1 kontrola) i Thy1Tlr2-/ miševe (Thy1Tlr2-/ kontrola), te njihove odgovarajuće ipsilateralne (IL) i kontralateralne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

Po etna prosje na vrijednost IOD-a za YFP je bila ne-to nifla kod Thy1Tlr2-/ mi-eva ($3,1 \times 10^7$ ipsilateralno; $3,2 \times 10^7$ kontralateralno) u odnosu na Thy1 skupinu ($3,6 \times 10^7$ ipsilateralno; $3,9 \times 10^7$ kontralateralno). Obzirom da te skupine sadrfle po 3 uzorka, u njihovim se dalnjim statisti kim usporedbama koristio neparametrijski Mann-Whitney test.

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

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

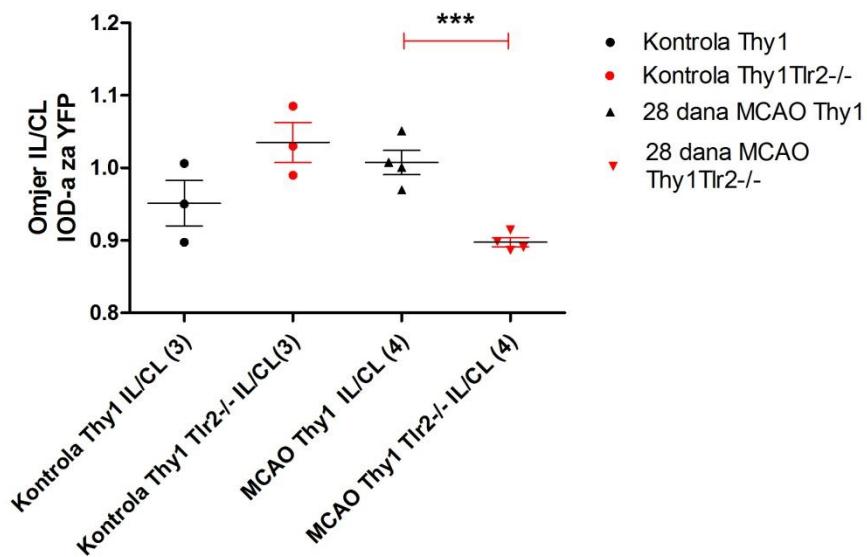


Slika 38. Izmjjerene vrijednosti IOD-a za YFP u kori mozga kontrolnih životinja bez ishemije (Kontrola Thy1 IL/CL i Kontrola Thy1Tlr2-/ IL/CL) te životinja tretiranih s MCAO (MCAO Thy1 IL/CL, MCAO Thy1Tlr2-/IL/CL) 28 dana nakon ishemiskog oštećenja. Crveno su označene skupine s onemogućenim TLR2.

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

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

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



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

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

Omeri IOD-a za YFP	Thy1	P Thy1	Thy1Tlr2-/-	P Thy1 Tlr2-/-	P Thy1 vs Thy1Tlr2-/-
Kontrola	$0,9513 \pm 0,0313$	0,2286	$1,035 \pm 0,0276$	0,0571	0,2
MCAO (28 dana)	$1,007 \pm 0,0168$		$0,8974 \pm 0,0161$		

5.5. Izražaj gena uključenih u signalni put TLR2

Kako bi se istraffio izraflaj mRNA gena uključenih u signalni put TLR2 u akutnoj, subakutnoj i kroničnoj fazi oporavka od MCAO, izolirane su mofldane polutke mi-eva neposredno prije, 72 sata, 1 tjedan te mjesec dana nakon ishemijskog o-te enja. Pomo u TaqMan® testova za izraflaj gena kvantitativnim real-time PCR-om reverzne transkriptaze istraflene su razine mRNA kod *Tlr2*-/- i WT mi-eva.

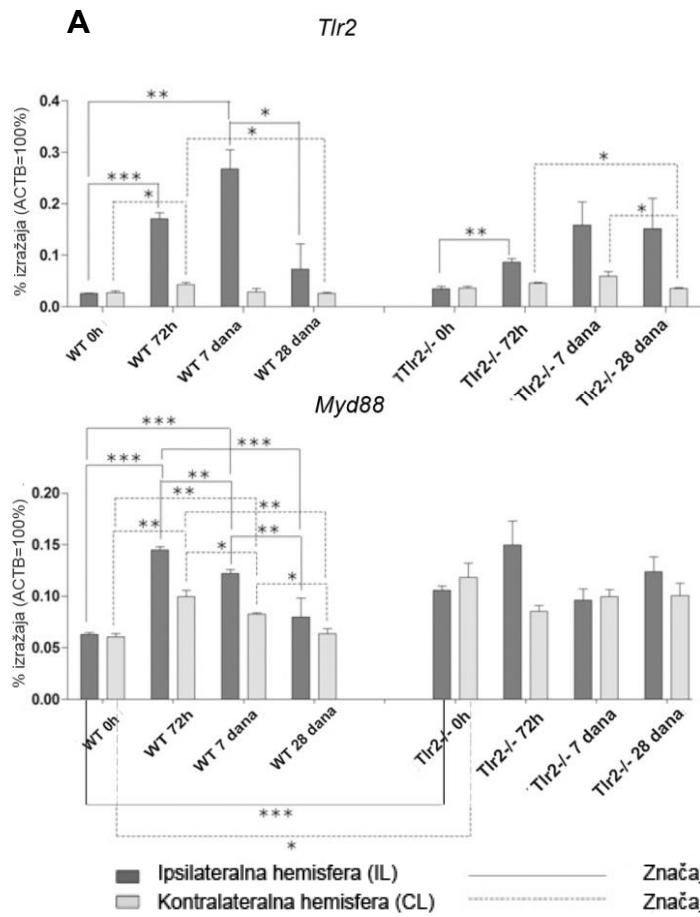
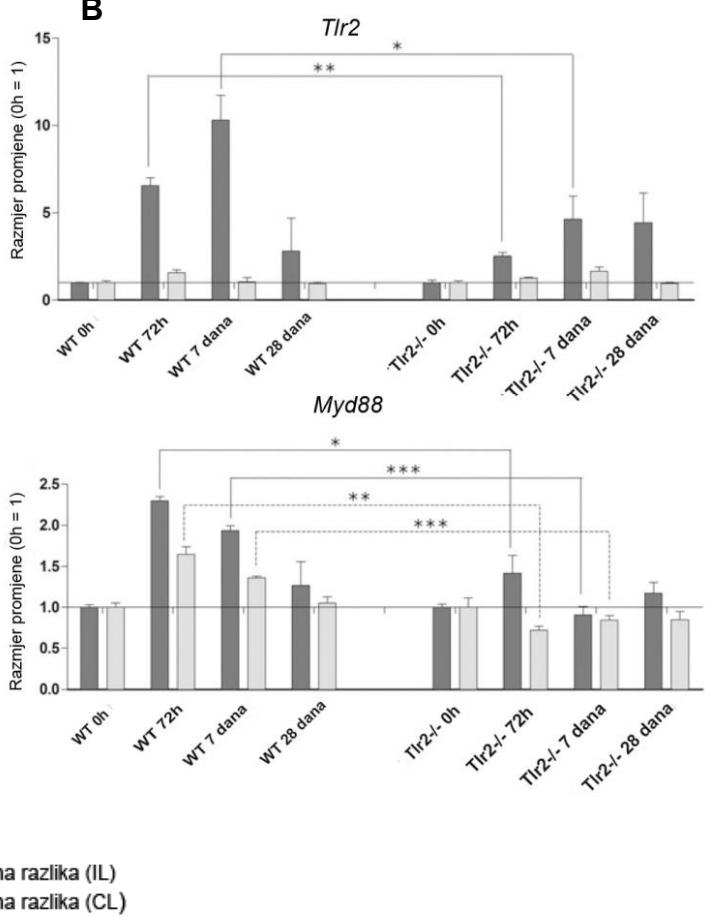
5.5.1. Sporiji porast izražaja *Tlr2* nakon ishemijskog oštećenja kod *Tlr2*-/- u odnosu na miševe divljeg tipa

Kako bi se procijenio izraflaj TLR2 kao receptora koji zapo inje signalnu kaskadu, kod *Tlr2*-/- mi-eva koristila se skraena mRNA za *Tlr2*. Koristio se dio mRNA gena *Tlr2* koji nije bio zahvaen tijekom postupka stvaranja *Tlr2*-/- onemogu enog mi-a (knock-out), kako bi se iste po etnici mogle koristiti za kvantitativni PCR kod oba genotipa (WT, *Tlr2*-/-). Na takav način bilo je moguće pratiti razinu izraflaja *Tlr2* te u kakvom je odnosu obzirom na prisutnost/odsutstvo bjelančevine TLR2.

Izraflaj skraene *Tlr2* mRNA u *Tlr2*-/- mi-evi 72 sata nakon MCAO se značajno povećao u svim ispitivanim uzorcima, osim u kontralateralnoj hemisferi *Tlr2*-/- mi-eva (Slika 40.). Visoke razine skraene *Tlr2* mRNA bile su prisutne i tjedan dana nakon MCAO te su se potom znajućno smanjile u vremenskoj točki od mjesec dana u svim uzorcima osim u ipsilateralnoj hemisferi *Tlr2*-/- gdje su bile prisutne i nadalje.

Usporedujući i WT i *Tlr2*-/- mi-eve, uočeno je znatno više izraflaj skraene mRNA *Tlr2*, nego li kod *Tlr2*-/- 72 sata i 7 dana nakon ishemijskog o-te enja.

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

A**B**

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

Gen *Myd88* kodira adaptor koji je potreban za zapo injanje signalnog puta TLR2. Kod divljih tipova izraflaj *Myd88* na razini mRNA je bio povean u obje mofldane hemisfere, pokazuju i najvi-u razinu 72h nakon MCAO, a potom se postupno smanjivao na razine kontrola 1 mjesec nakon MCAO. *Tlr2-/-* mi-evi nisu pokazali značajnu promjenu u izraflaju *Myd88* mRNA ni u jednoj hemisferi (Slika 40.).

Po etno razina *Myd88* kod *Tlr2-/-* koja se koristila kao kontrola bila je znatno vi-a od po etne razine kod divljeg tipa.

Kod mi-eva koji imaju funkcionalan TLR2, izraflaj *Myd88* je potaknut u ranim fazama oporavka nakon ishemije. Ukoliko TLR2 nije prisutan, po etno postoji obilniji rezervoar *Myd88* mRNA, no sam odgovor na ishemiju leziju nije značajan.

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

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

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

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

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

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

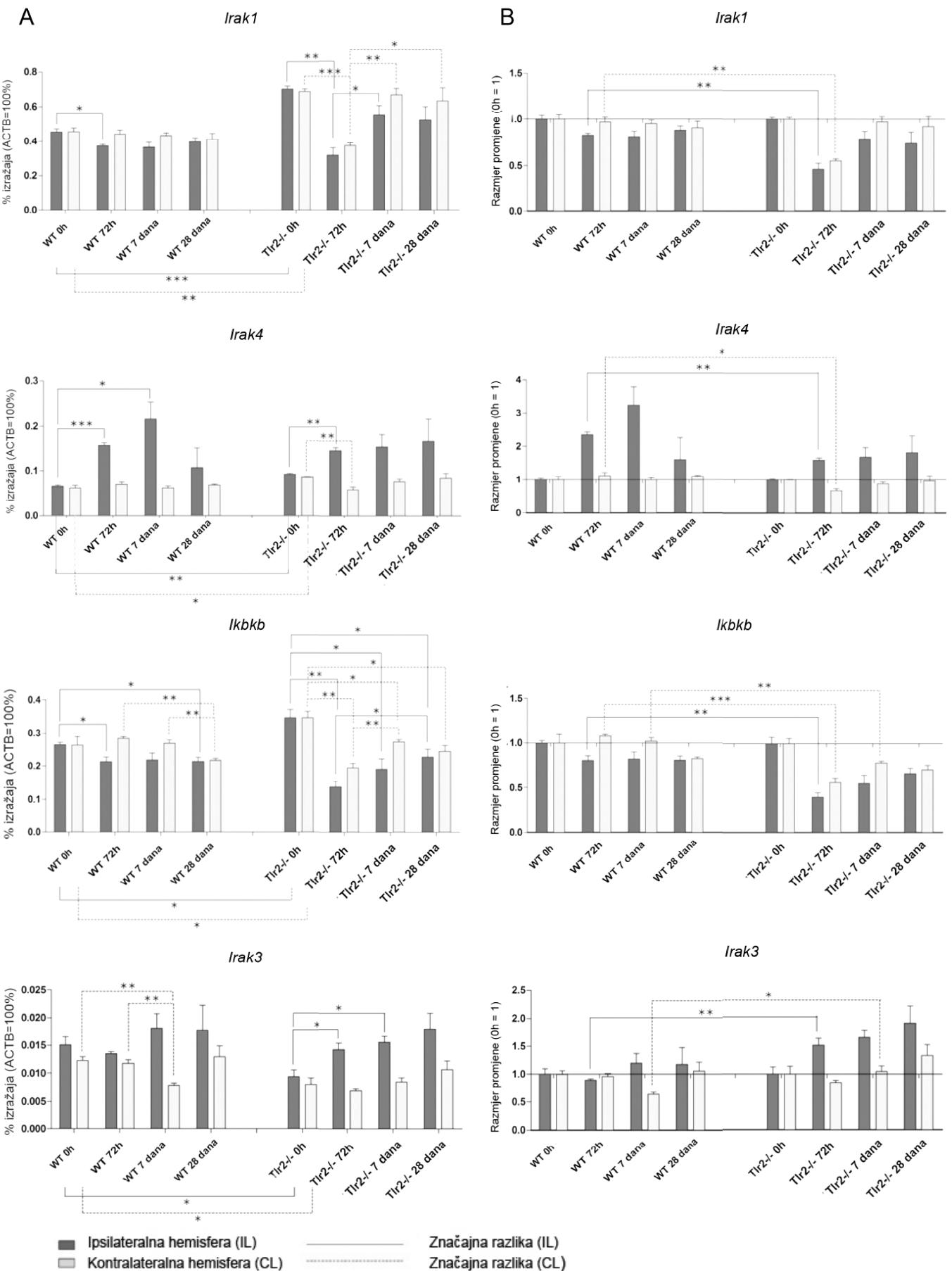
Tlr2-/ mi-evi su imali, kao i za *Myd88* i *Irak1*, zna ajno ve i rezervoar *Irak4* mRNA, no i znatno slabiji ekspresijski odgovor za *Irak4* u obje hemisfere 72 sata nakon MCAO.

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

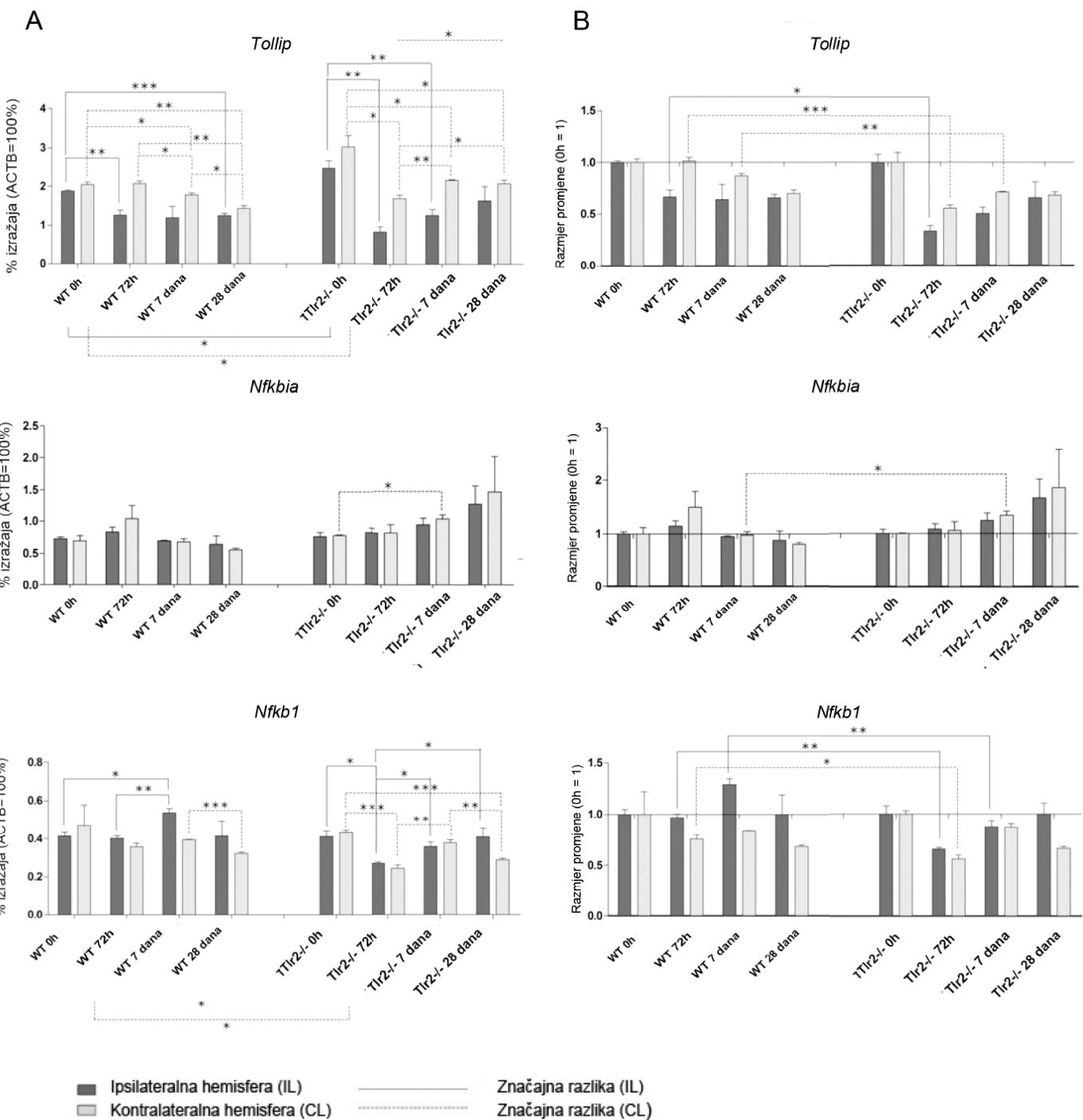
Ikbkb se smatra aktivatorom signalnog puta TLR2 jer njegov inhibitor inhibira *Nfkb1*. Izraflaj *Ikbkb* se smanjio 72 sata nakon ishemije kod oba genotipa, no kod Tlr2-/ su se kasnije postupno pove avale, dok je kod divljeg tipa gen ostao uti-an.

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

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



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



Slika 42. Razine izražaja mRNA za Tollip, Nfkbia i Nfkbl1. Podaci su prikazani na 2 načina: A) razine mRNA svakog gena su prikazane kao postotak u odnosu na razine izražaja endogene kontrole (Actb) i B) podaci svake hemisfere u određenoj vremenskoj točki su normalizirani na vrijednosti kontrole (kontrola = 1). Razlike među hemisferama su bile statistički značajne ako je $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (***) i $p < 0.005$ (***).

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

Po etna razina mRNA za *Irak3* je kod Tlr2-/ bila nifla u odnosu na razine kod divljeg tipa, a izraflaj je bio poja an u ipsilateralnoj hemisferi 72 sata, odnosno u kontralateralnoj hemisferi 7 dana nakon MCAO.

Nedostatak funkcionalnog *Tlr2* dovodi do smanjenja konstitutivnog izraflaja mRNA za *Irak3*, a reaktivnog poja avanja nakon MCAO. Kod divljeg tipa dolazi do uti-avanja gena za Irak3 u kroni noj fazi nakon ishemije.

Izraflaj mRNA za *Tollip* smanjio se u obje hemisfere WT mi-eva, osobito mjesec dana nakon MCAO kad postifle i najnifu razinu (Slika 43). Kod Tlr2-/ mi-eva je izraflaj mRNA za *Tollip* uti-an u obje hemisfere 72 sata nakon ishemije, te se potom postupno poveavao do po etne razine.

U usporedbi s divljim tipom, kod Tlr2-/ mi-eva se pokazalo izrazitije uti-avanje gena za *Tollip* 72 sata nakon MCAO u obje hemisfere, te tjedan dana nakon MCAO u kontralateralnoj hemisferi. Po etna razina izraflaja *Tollip* gena bila je poveana kod Tlr2-/ mi-eva.

Stoga se mofle zakljuiti kako je *Tollip* uti-an nakon ishemijске lezije. Neaktivni *Tlr2* dovodi do poveanog rezervoara mRNA za *Tollip*, te uslijed nastupa ishemije dolazi do znatnog uti-avanja njegovog izraflaja.

Izraflaj mRNA za *Nfkbia* se nije promijenio u obje hemisfere divljeg tipa, ni kod ipsilateralne hemisfere Tlr2-/ mi-eva, no u njihovoj se kontralateralnoj hemisferi povisio tjedan dana nakon ishemijске lezije te je pri tom taj porast bio statistički značajan u usporedbi s odgovaraju im vrijednostima divljeg tipa (Slika 42.).

Regulacija *Nfkbia* se nije znatno promijenila nakon MCAO, no postoji trend poveanja u kontralateralnoj hemisferi Tlr2-/ mi-eva tijekom kronične faze oporavka.

Izraflaj mRNA za *Nfkbl* se poveao u ipsilateralnoj hemisferi WT mi-eva tjedan dana nakon MCAO, a smanjio nakon mjesec dana (Slika 42).

Kod Tlr2-/ mi-eva izraflaj *Nfkbl* se smanjio u obje hemisfere 72 sata nakon MCAO te potom postupno vratio na po etnu razinu u vremenskoj točki od mjesec dana.

Tlr2-/ mi-evi imaju znacajno nište razine mRNA za *Nfkbl* u obje hemisfere 72 sata, te u ipsilateralnoj hemisferi tjedan dana nakon ishemijске lezije.

Odgovor na ishemiju u regulaciji *Nfkbl* bio je vidljiv samo u kroničnoj fazi oporavka. Neaktivni *Tlr2* nije doveo do poja avanja izraflaja *Nfkbl*, već naprotiv, njegove su razine izraflaja bile znatno nište u usporedbi s WT skupinom.

5.5.3. Odgovor pojačavanja izražaja gena za *Tnf* je smanjen kod Tlr2-/ u odnosu na miševe divljeg tipa

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

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

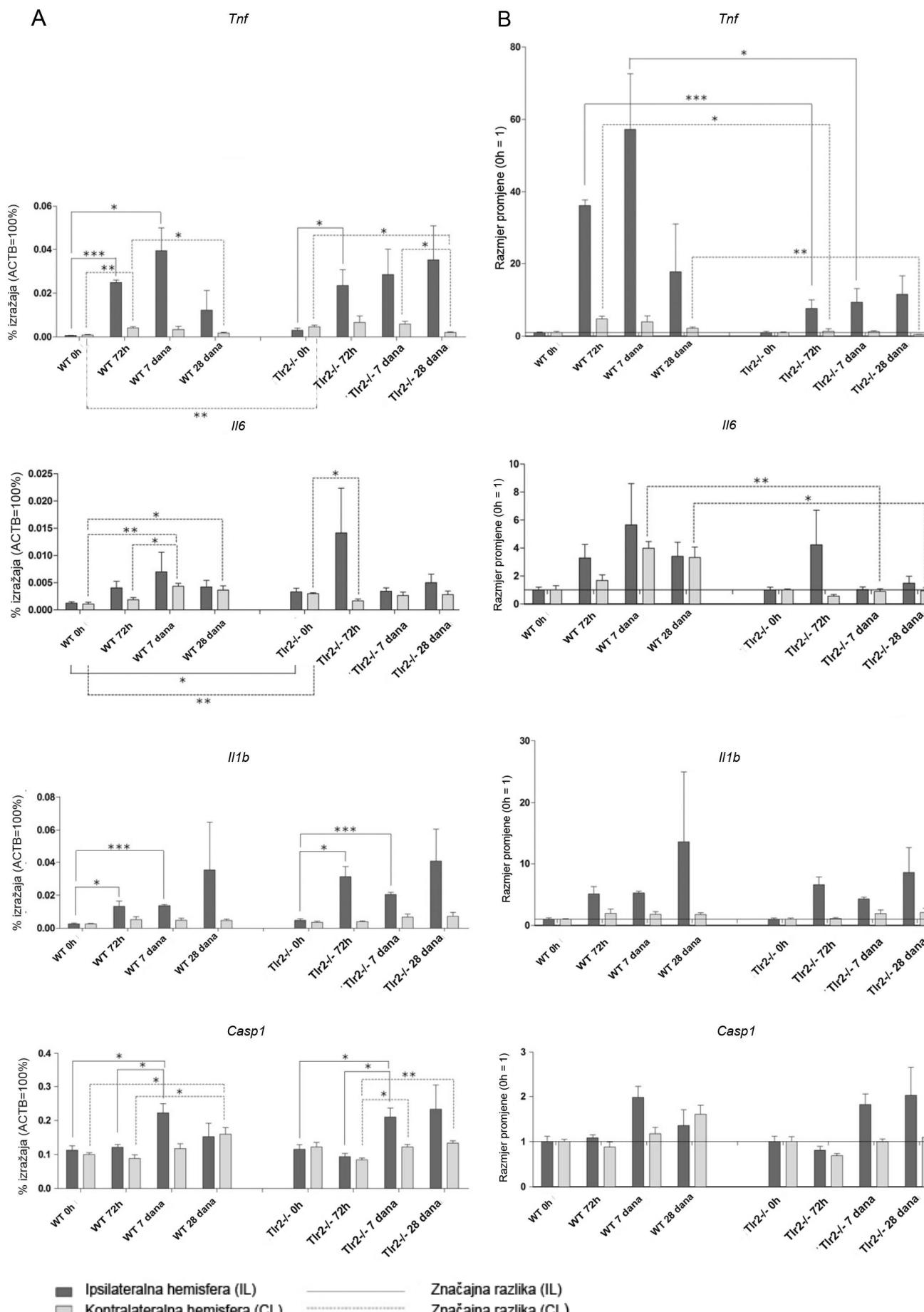
Tlr2-/ skupina je u usporedbi s WT pokazala znatno manje pojačanje izraflaja mRNA za *Tnf* u obje hemisfere 72 sata nakon MCAO. Pri tom je po etno razina mRNA za *Tnf* bila znatno manja kod Tlr2-/ mi-eva.

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

Izraflaj mRNA za *Il6* nije se promijenio u ipsilateralnoj hemisferi oba genotipa nakon MCAO. U kontralateralnoj hemisferi divljeg tipa pojačanje u vremenskoj skali od 7 dana i ostao na istom nivou do 28. dana. Kod Tlr2-/ mi-eva je nastupilo znatno povećanje *Il6* u kontralateralnoj hemisferi 72 sata nakon MCAO.

Kod Tlr2-/ mi-eva po etno postoji znatno veća količina mRNA za *Il6*, a nakon MCAO ne dolazi do porasta u kontralateralnoj hemisferi te su razine znatno niže u vremenskim periodima od 7 do 28. dana.

Nakon MCAO dobro je da pojačanje izraflaja mRNA za *Il1b* u ipsilateralnim hemisferama oba genotipa, dok kontralateralna hemisfera nije pokazivala promjene. *Casp1* se pojačava u obje hemisfere oba genotipa, te kao i kod *Il1b* nije uočena razlika u regulaciji tog gena nakon MCAO.



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

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

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

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

Kod *Tlr2*-/- je dobro do značajnog povećanja izraflaja *Casp8* u obje hemisfere postiflu i vrhunac 7 dana nakon MCAO. U usporedbi s WT skupinom, u vremenskoj točki od tjedan dana *Tlr2*-/- mi-evi imaju značajno veći izraflaj *Casp8* u obje hemisfere, dok u vremenskoj točki od mjesec dana u kontralateralnoj hemisferi imaju značajno manji izraflaj istog gena.

Po etno razini *Casp8* kod *Tlr2*-/- je značajno povećana kod *Tlr2*-/- mi-eva.

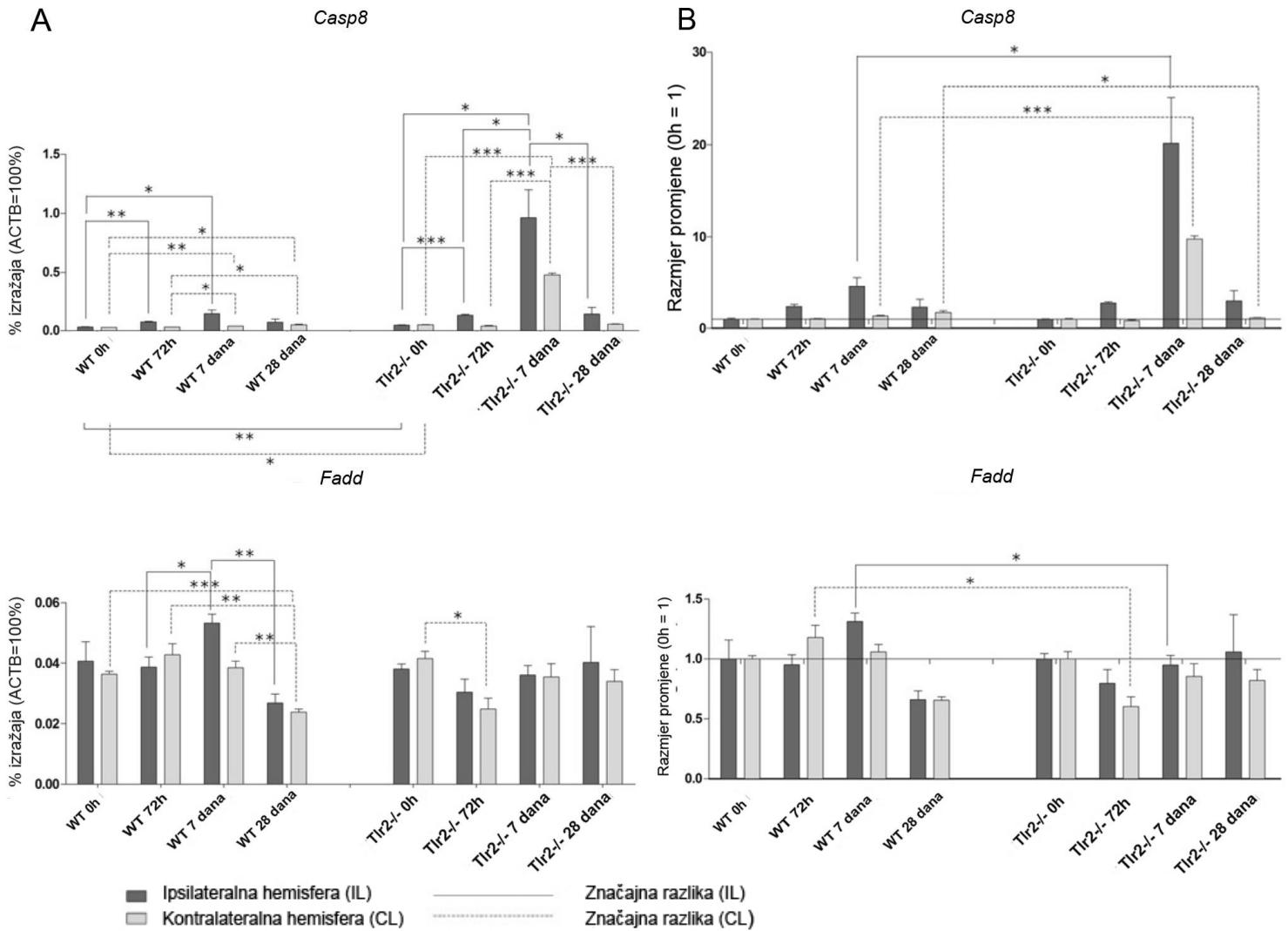
Neaktivni *Tlr2* dovodi do povećanja rezervoara *Casp8* u mirovanju, ali i do značajnog povećanja izraflaja u subakutnoj fazi oporavka.

Izraflaj mRNA za *Fadd* se značajno povećava kod WT u ipsilateralnoj hemisferi tjedan dana nakon MCAO i potom je značajno utican u vremenskoj točki od mjesec dana. U kontralateralnoj hemisferi divljeg tipa, *Fadd* se znatno utiče nakon mjesec dana.

Kod *Tlr2*-/- mi-eva nije bilo promjene u izraflaju *Fadd* u ipsilateralnoj hemisferi, ali je 72 sata nakon MCAO u kontralateralnoj hemisferi nastupilo značajno uticanje.

U usporedbi s WT, *Tlr2*-/- mi-evi su imali značajno nisku razinu mRNA za *Fadd* u ipsilateralnoj hemisferi tjedan dana, te u kontralateralnoj hemisferi 72 sata nakon MCAO.

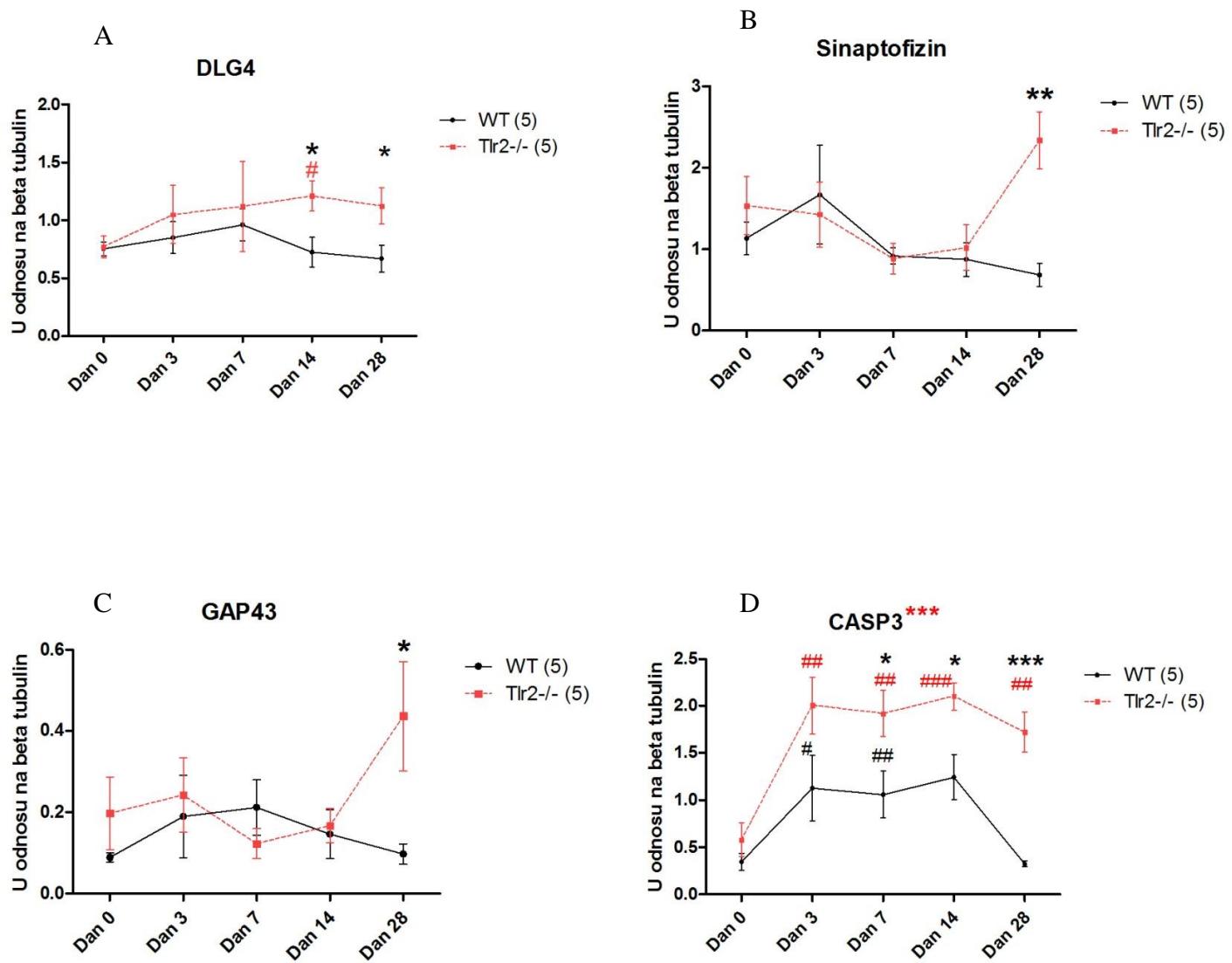
Dok je tjedan dana nakon MCAO izraflaj mRNA za *Fadd* pojačan, kod *Tlr2*-/- mi-eva nije bilo prisutno takvo pojačanje.



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

5.6. Povećana prisutnost biljega sinapsi i neuralnog stresa kod Tlr2-/‐ u odnosu na miševe divljeg tipa

Bjelan evine sinaptogeneze (DLG4, sinaptofizin), aksonogeneze (GAP43) i neuralnog stresa (CASP3) se razlikuju u izraflaju kod WT i Tlr2-/‐ mi‐eva mjereno Western blotom (Slika 46.).



Slika 45. Izražaj bjelančevina DLG4(A), sinaptofizina (B), GAP43 (C) i CASP3 (D) u ipsilateralnoj moždanoj kori ispitivano Western blotom u odnosu na bjelančevinu održavanja stanice beta-tubulin u vremenskoj točki 0 za početne vrijednosti te 3, 7, 14 i 28 dana nakon ishemijskog oštećenja. Crtkanoo je označena skupina s onemogućenim TLR2.

5.6.1. Odsutstvo funkcionalnog TLR2 povećava količinu biljega sinapsi DLG4 i sinaptofizina u kroničnoj fazi oporavka od ishemijskog oštećenja u odnosu na miševe divljeg tipa

Kod analize izraflaja bjelan evine DLG4 (omjer koli ine u odnosu na β -tubulin), koja predstavlja postsinapti ku sastavnicu sinapse, nisu postojale razlike u po etnim vrijednostima izme u genotipa, obzirom da je tad prosje na vrijednost kod WT iznosila $0,75 \pm 0,06$, a kod Tlr2-/ skupine $0,77 \pm 0,09$ (Tablica 25).

Tre i dan nakon MCAO dolazi do blagog porasta koli ine DLG4 na prosje nu vrijednost od $0,85 \pm 0,14$ kod WT skupine, odnosno ne-to intenzivnijeg porasta na $1,05 \pm 0,25$ kod Tlr2-/-. 7. dan porast izraflaja bjelan evine DLG se i dalje nastavlja pove avati polagano na $0,96 \pm 0,14$ kod divljih tipova, a kod Tlr2-/ mi-eva u ve oj mjeri na $1,12 \pm 0,39$.

Dva tjedna nakon ishemijskog o-te enja kod WT skupine mi-eva zapo inje trend opadanja koli ine DLG4 na $0,73 \pm 0,13$, dok kod skupine bez funkcionalnog TLR2 vrijednost DLG4 i dalje nastavlja blago rasti na $1,21 \pm 0,13$ te je prosje na razlika srednjih vrijednosti $0,4847 \pm 0,1836$, -to je s 95% intervalom pouzdanosti od 0,9 do 0,7 statisti ki zna ajno s $P=0,0269$.

Uspore uje li se taj rezultat s po etnim vrijednostima kontrolne Tlr2-/ skupine ($0,77 \pm 0,09$), razlika je s prosje nom razlikom srednjih vrijednosti od $0,4388 \pm 0,16$ tako er statisti ki zna ajna s $P=0,0251$ (95% IP= 0,8 do 0,07).

Srednja vrijednost koli ine bjelan evine DLG4 kod WT skupine nastavila je padati u odnosu na 7. dan te je u vremenskoj to ki 28. dana iznosila $0,67$ ($SEM= \pm 0,117$), dok je kod Tlr2/- ta vrijednost tako er po eli opadati u odnosu na maksimalnu vrijednost 14. dana, ali je i dalje sa srednjom vrijednosti $1,125$ ($SEM= \pm 0,1548$) bila vi-a od vrijednosti divljih tipova. S razlikom srednjih vrijednosti od $0,46 \pm 0,19$ i 95% IP od $0,9054$ do $0,006$, ta je razlika statisti ki zna ajna s $P=0,0475$.

Tablica 25. Količina bjelančevine DLG4 u odnosu na β -tubulin sa standardnom pogreškom po vremenskim točkama nakon MCAO za miševe divljeg tipa (WT) i Tlr2/- s P vrijednostima za t-test u odnosu na Dan 0 unutar genotipa, te po vremenskim točkama između genotipova.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

U akutnoj vremenskoj toki od 3 dana količina CASP3 bjelančevine kod uzoraka WT skupine naglo raste te se gotovo udvostručava ($1,13 \pm 0,35$) i na toj razini persistira i 7. ($1,06 \pm 0,25$) i 14. dana ($1,24 \pm 0,24$) kad se statistički zna da je razlika od svoje početne vrijednosti mjereno t-testom ($0,0265; 0,0077$). Mjesec dana nakon MCAO razina CASP3 bjelančevine kod WT mi-eva se vraća na početne vrijednosti ($0,322 \pm 0,03$).

Tlr2/- mi-ovi intenzivnije reagiraju na ishemijsku leziju etverostrukom povećavajući količinu CASP3 u akutnoj vremenskoj toksičnosti 3. dana ($2,0 \pm 0,3$). Pri tom se statistički zna da je razliku od svojih početnih vrijednosti ($P=0,0038$). Potom dinamika izraflaja CASP3 bjelančevine prati dinamiku detektiranu kod divljih tipova tako da ostaje povišena i 7. i 14. dan nakon ishemijske lezije. Pri tome je razina CASP3 statistički zna da je povišena kod Tlr2/- u usporedbi s mi-ovima WT skupine ($P=0,0396$), ali ponovno i u vrijednosti vlastitih lažno operiranih kontrola ($P=0,0023$).

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

U kroničnoj fazi oporavka dolazi do rezolucije i kod Tlr2/- mi-eva u pogledu količine CASP3, no ona opada blaže nego što je kod mi-ova koji imaju funkcionalan TLR2. Dok se kod WT skupine vrijednosti CASP3 detektirane Western blotom vraćaju na početne, kod mi-eva bez funkcionalnog TLR2 razina se spušta na vrijednost koja je i dalje trostruko veća od kontrole te se statistički izrazito zna da je razliku i od početnih vrijednosti za vlastiti genotip ($P=0,0033$), ali i u usporedbi s WT skupinom izloženoj MCAO ($P=0,002$).

Takav rezultat pokazuje snage izraflaja CASP3 na razini bjelančevine u mirovanju, ali osobito nakon MCAO kod Tlr2/- mi-eva u odnosu na WT koji sadrže TLR2, što dovodi do zaključka kako putevi neovisni o TLR2 koji su u njegovom odsudstvu počinju ranije, ranije dovode do početne anog uključivanja proapoptotičnih imbenika te takvi signalni putovi preživljavaju duže nego što je u prisutstvu funkcionalnog TRL2.

5.7. GAP43 i CASP3 su biljezi neuralnog stresa

Obzirom da je kod Tlr2-/ mi-eva u ena deregulacija signalog puta TLR2 i o-te enje funkcije uro ene imunosti posredovane TLR2, rezultati dosada-njih funkcionalnih i molekularnih usporedbi Tlr2-/ skupina s mi-evima koji imaju djelatan TLR2 ukazuju na zna ajne parametre s potencijalom da se koriste kao biljezi za aktivnost upale i regeneracije, odnosno detekciju imunolo-ki posredovanog neuralnog stresa koji predstavlja -ansu za daljnje pogor-anje ili oporavak. Ti bi biljezi u budu nosti omogu avali standardizirano pra enje tolerancije na ishemisko o-te enje uslijed reprogramiranja bilo kojeg dijela imunolo-kog odgovora koji se izvr-ava putem TLR2.

Kako bi neki od navedenih pokazatelja predstavljali dobre kandidate za biomarkere, potrebno je da su snaflno poja ani ili, s druge strane, snaflno uti-ani tijekom oporavka od ishemiskog o-te enja, te da postoji jednostavan i neinvazivni na in njihovog pra enja.

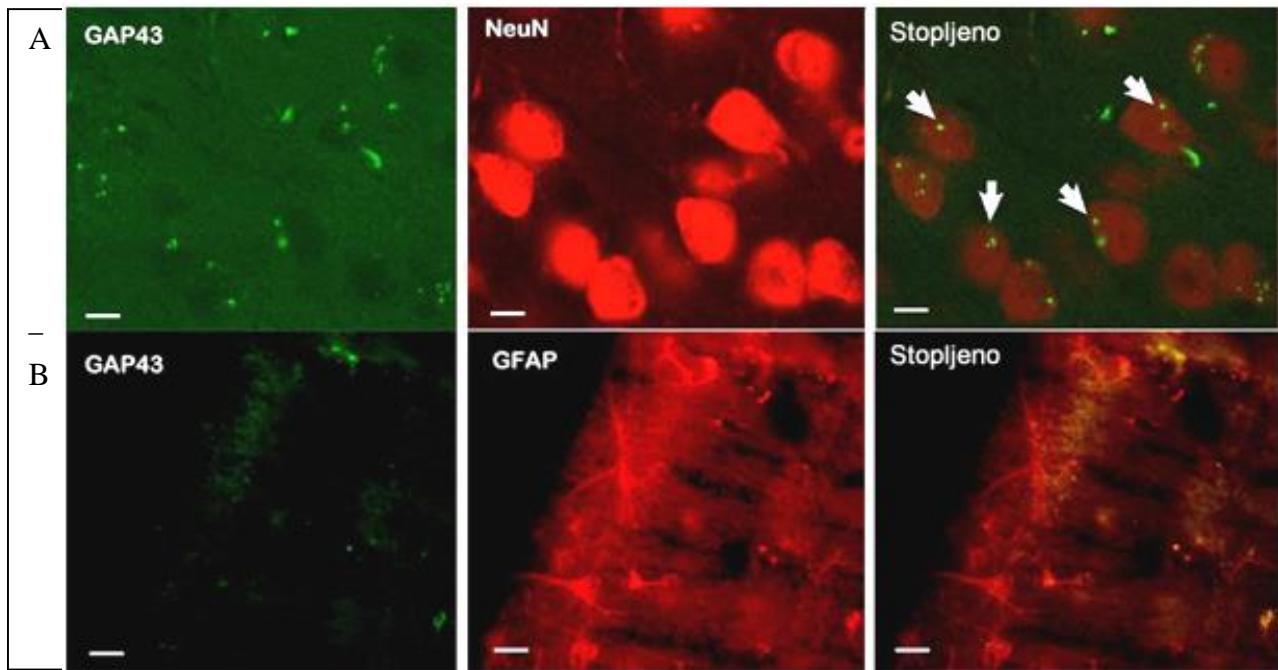
Od imbenika koji pokazuju oporavak neuralne mrefle, kao zna ajna bjelan evina identificiran je GAP43 koji radi svojeg izraflaja tijekom razvoja aksona integrira neurogenezu i sinapti ku plasti nost na razini arborizacije novopotaknutih stanica.

Kako je najintenzivniji odgovor na razini bjelan evina u usporedbi Tlr2-/ i WT mi-eva na en promatraju i dinamiku izraflaja CASP3 nakon ishemiskog o-te enja, kao drugi biljeg odabran je biljeg CASP3 koji svojom dominantno proapoptoti kom funkcijom predstavlja destruktivni krak na postishemijskoj prevagi.

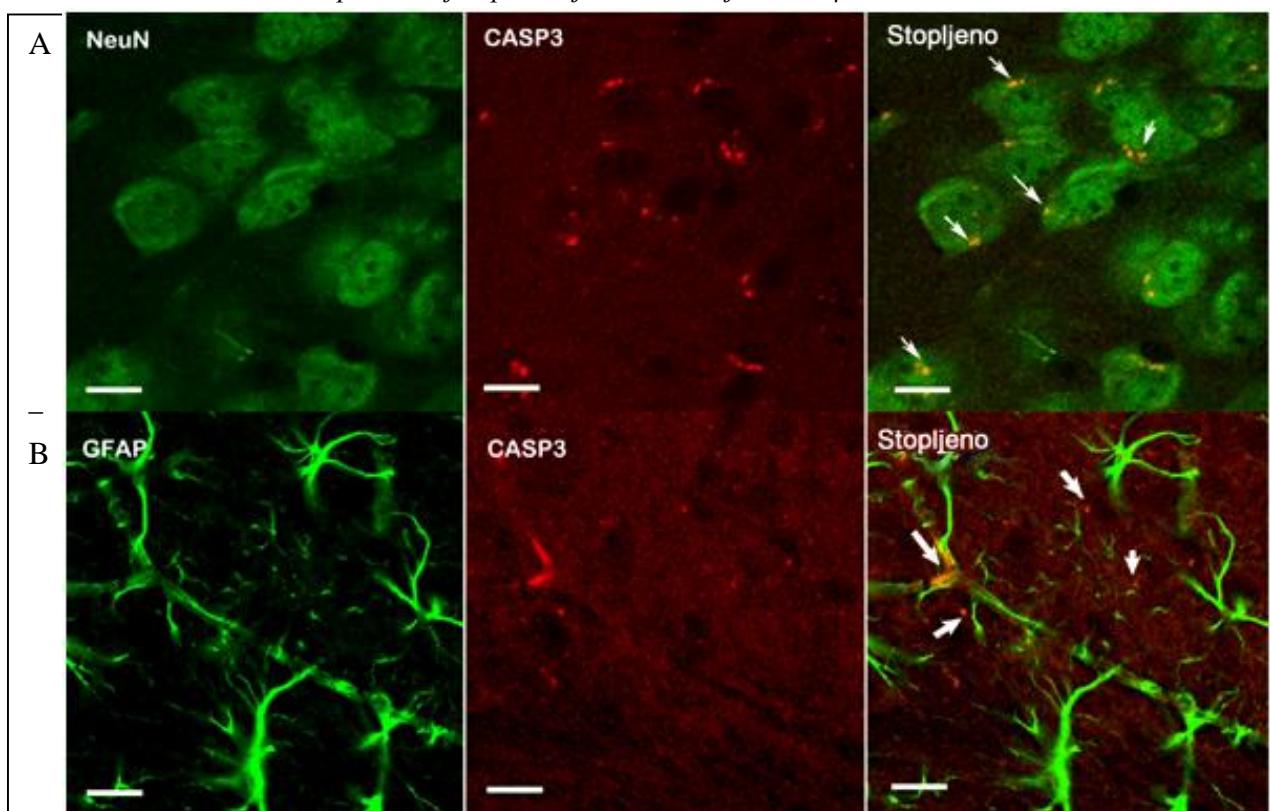
Stoga se pristupilo analizi njihove unutarstani ne zastupljenosti prije i nakon ishemiskog o-te enja i nalaflenju metodolo-kog pristupa za njihovu *in vivo* detekciju.

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

Kako bi se odredilo koje su stanice sadrjavale GAP43 i CASP3, provela se dvostruka imunohistokemija za biljege astrocita i neurona na tkivu mi-jeg mozga zahva enom ishemijom. Dvostruka imunohistokemija s GAP43 i NeuN protutijelima otkrila je da je GAP43 prisutan isklju ivo u neuronima (Slika 46., A.). Na temelju bojenja s GAP43 i GFAP (glijalna fibrilarna kisela bjelan evina, biljeg astrocita) nije na ena prisutnost GAP43 u astrocitima (Slika 46., B.). Biljeg CASP3 na en je tako er primarno u neuronima, dok je istovremeno bio prisutan i u astrocitima, no u manjoj mjeri (Slika 47., A i B).



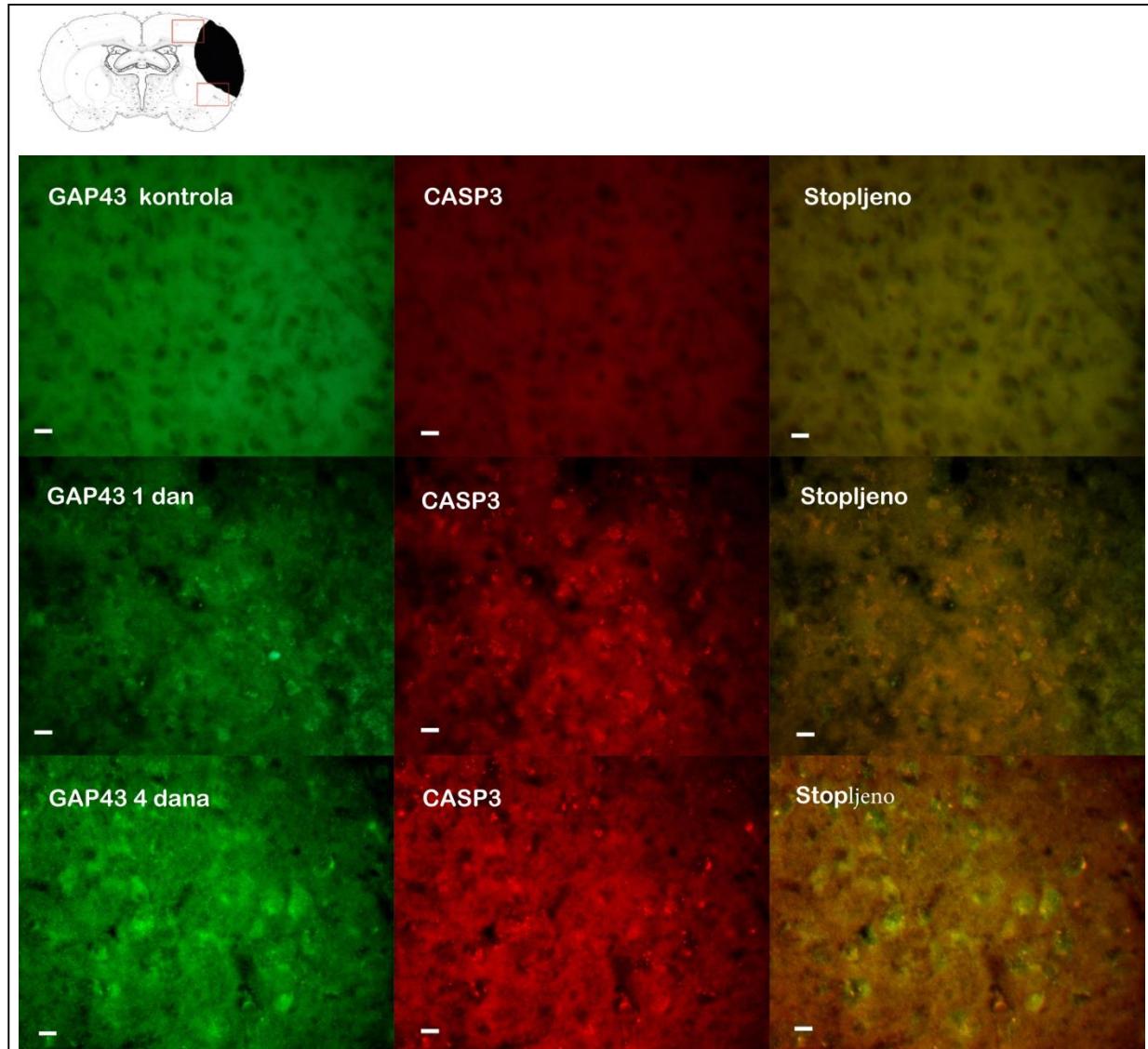
Slika 46. A) Imunohistokemija u kori mišjeg mozga oko oštećenja prikazuje signal GFP-a čiji je izražaj potaknut promotorom Gap43 gena (zeleno) pokazuje kolokalizaciju s biljem Neunom (crveno). B) Imunohistokemija u perilezionalnoj kori mišjeg mozga prikazuje signal GFP-a (zeleno) i signal GFAP-a biljega astrocita (crveno), bez kolokalizacije u ishemiskoj penumbri. Crveni pravokutnici na shematskom prikazu označavaju perilezionalni korteks koji je uz homotopni kontralateralni korteks predstavlja područje analize. Mjerilo 20 µm.



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

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

Imunohistokemija je pokazala da ve jedan dan nakon MCAO, te jo-nagla-enje 4 dana nakon ishemijskog o-te enja, izraflaji GAP43 i CASP3 zna ajno rastu (t-test P<0,0001) (Slika 48.).



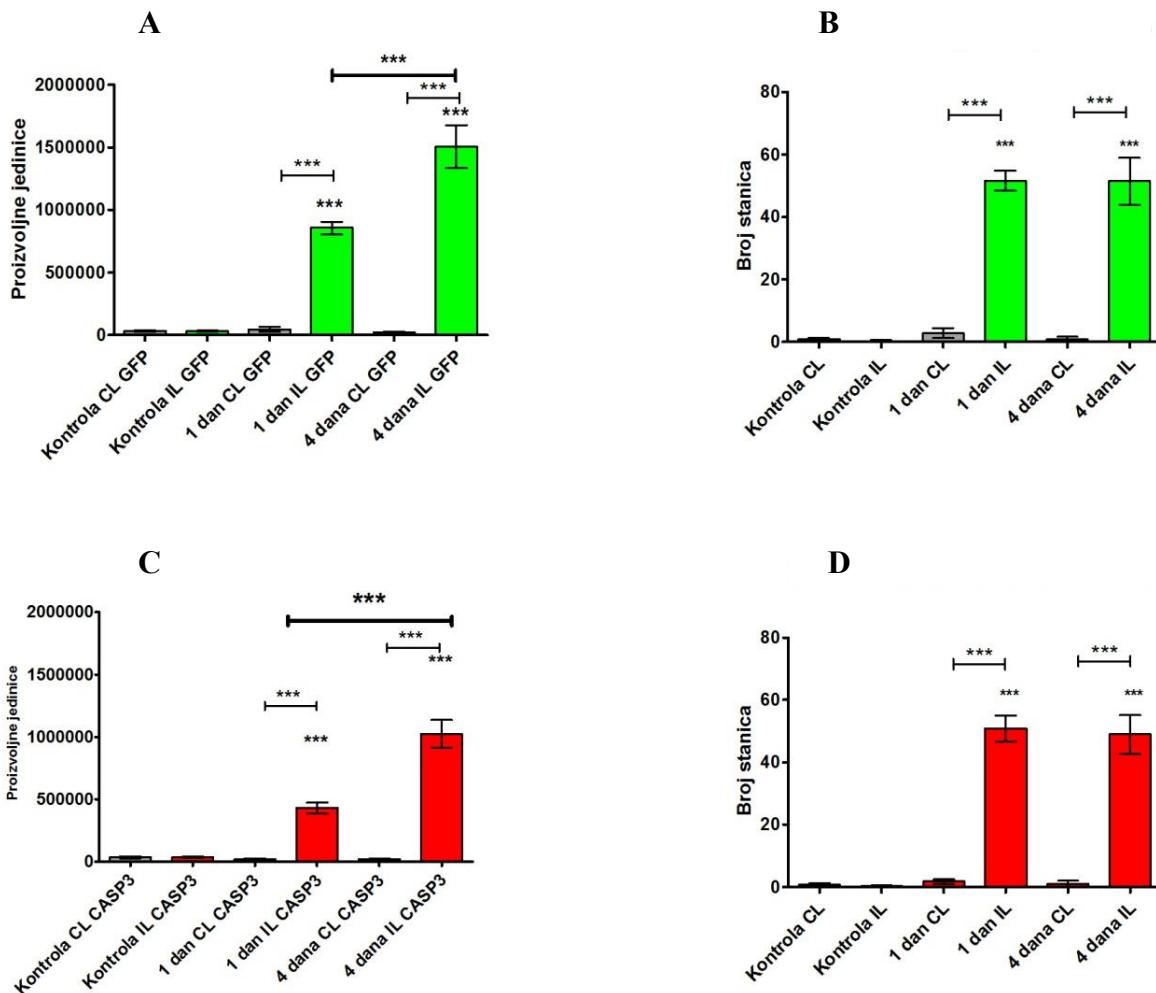
Slika 48. Imunohistokemija signala GFP-a (zeleno) potaknuta promotorom gena Gap43 i biljega CASP3 (crveno) kod lažno operiranih GAP43-luc/gfp kontrola te 1 i 4 dana nakon ishemijskog oštećenja u ipsilateralnoj kori. Jasno je vidljivo povećanje intenziteta signala za GAP43 i CASP3. Crveni pravokutnici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

Metoda integrirane optike pokazala je da se izraflaj biljega GAP43 poveao 27 puta 1. dan nakon ishemije, dok je 4 dana nakon MCAO poveanje iznosilo 47 puta, -to je u skladu s rezultatima kvantifikacije metodom Western blota.

Broj stanica pozitivnih na GAP43 povećao se 206 puta, a 4 dana nakon ishemije 205 puta u odnosu na kontrolu (Slika 49.), što nije detektirano Western blotom.

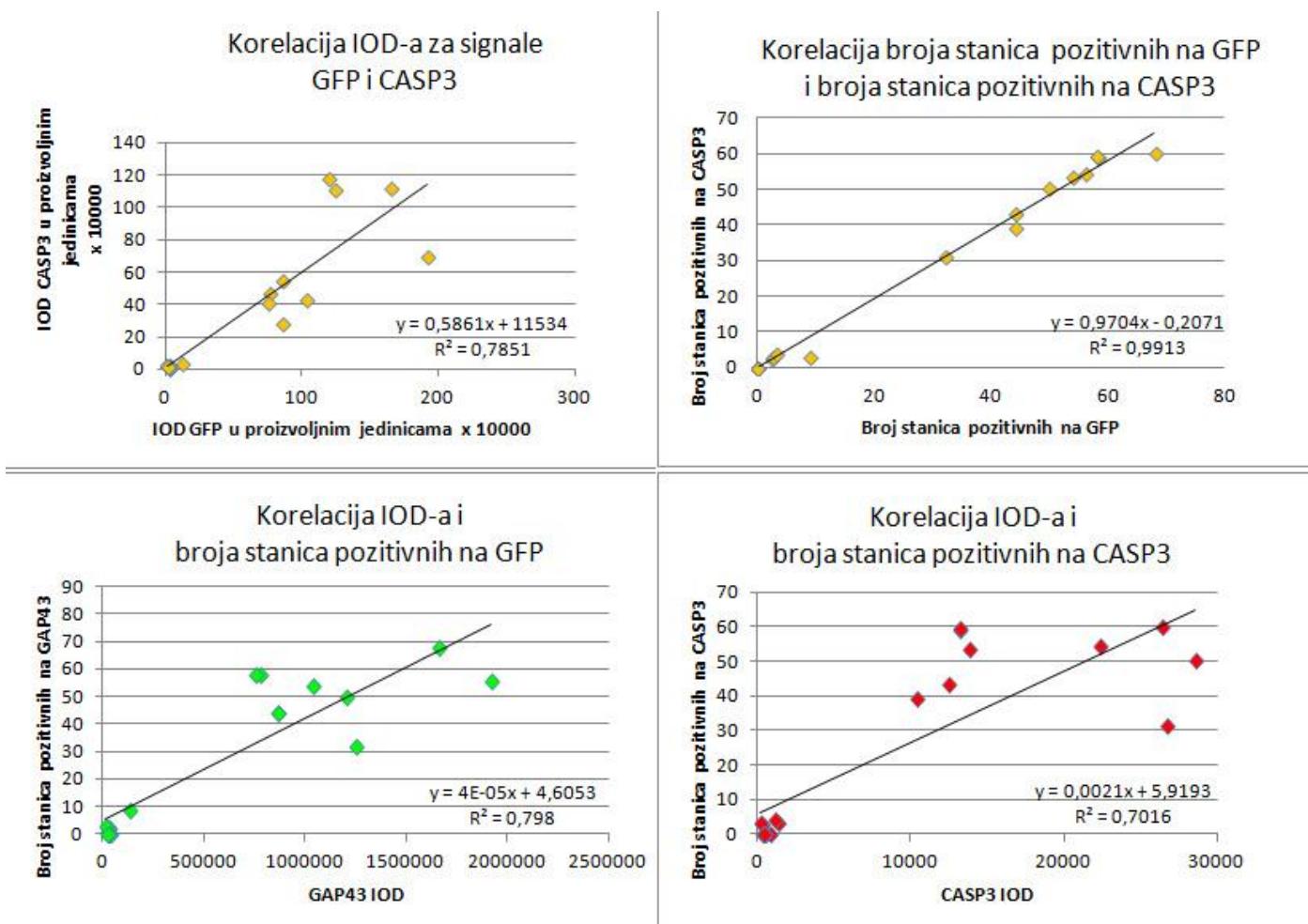
Integrirana optička gustoća za biljek CASP3 prvi dan povećala je 24 puta, a 4. dan nakon ishemijskog otevrenja akumulirala 42 puta u odnosu na kontrolu.

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



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

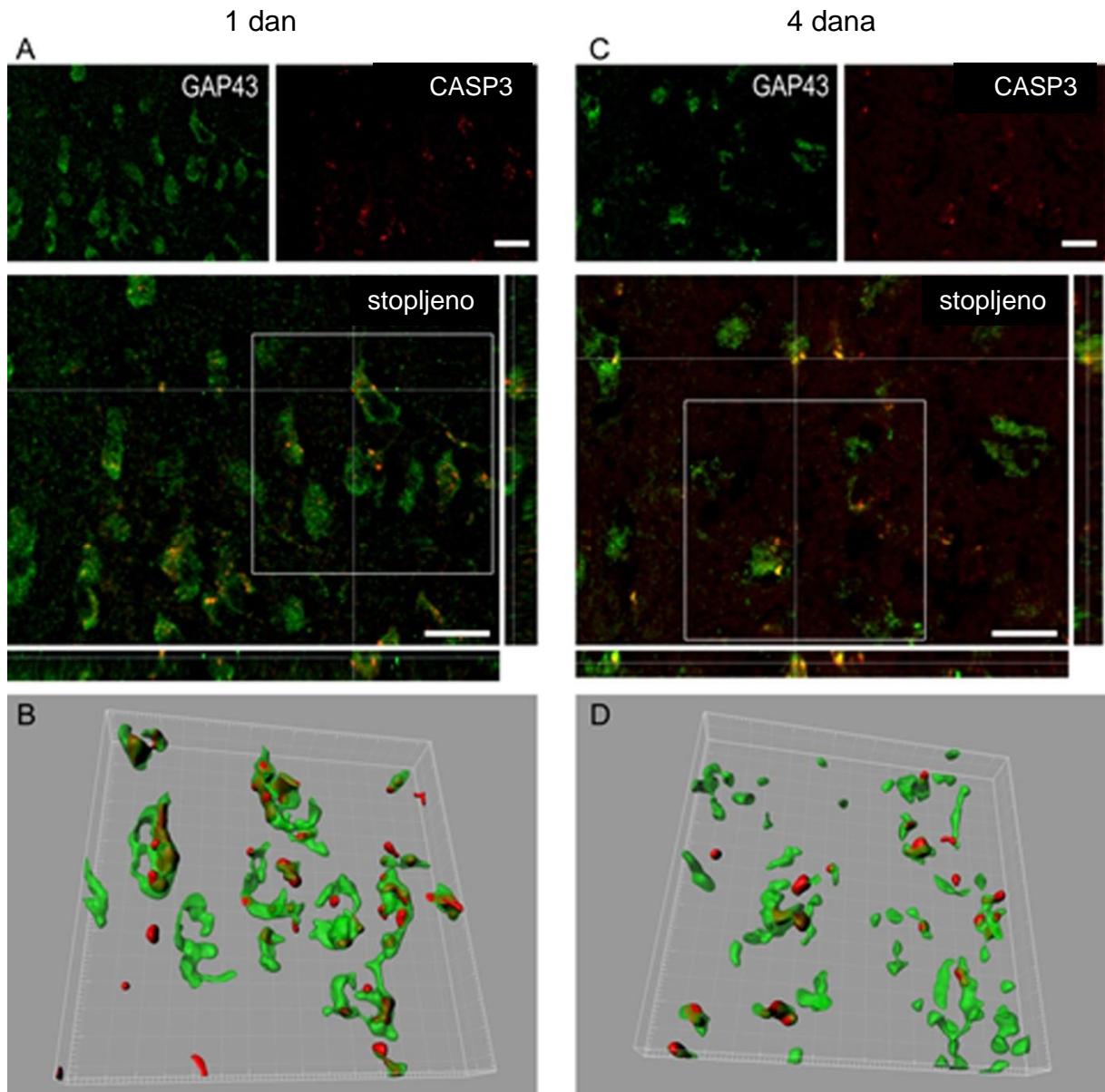
Povećanje signalata biljeka GAP43 nakon MCAO je koreliralo s intenzitetom signalata biljeka CASP3 mjereno integriranim optičkim gustoćom ($R^2 = 0.79$, Slika 51., A). Još je snažnija korelacija broja stanica pozitivnih na GAP43 i CASP3 ($R^2 = 0.99$, Slika 51., B).



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

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

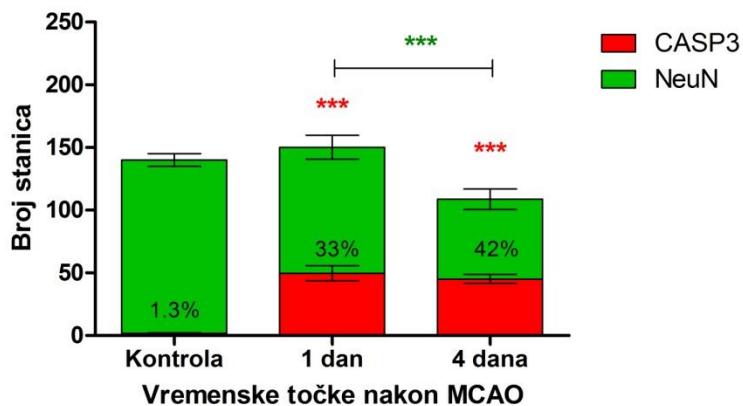
Kolokalizacija signala potvrđena je i uporabom konfokalnog mikroskopa te 3D rekonstrukcijom koristeći program Imaris® (Slika 51).



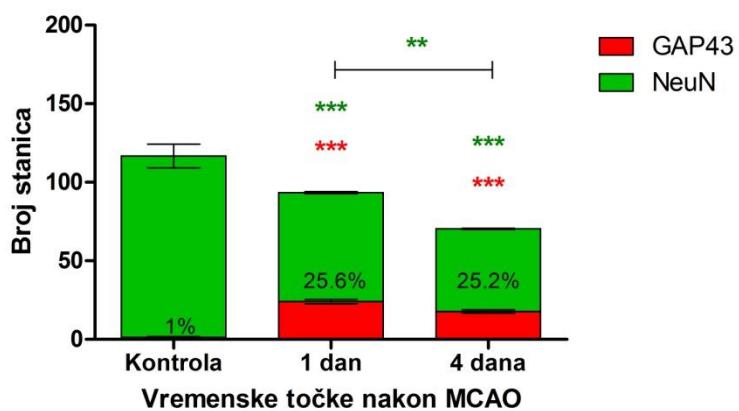
Slika 51. Prikaz signala GFP-a potaknutog promotorom gena za *Gap43* (zeleno, *GAP43*) i *CASP3* (crveno, *CASP3*) na konfokalnom mikroskopu. Stanje slika crvenog i zelenog kanala (stopljeno u A i C) te 3D rekonstrukcija uz pomoć programa *Imaris®* 1. (B) i 4. dan nakon ishemije.

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

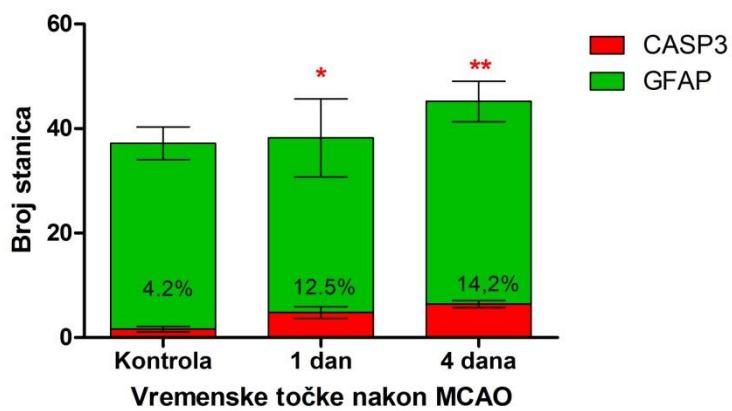
Biljeg astrocita, GFAP je kolokalizirao s *CASP3* u 4% stanica u zdravom mozgu te u 13% i 14% stanica 1. i 4. dan nakon MCAO, navedenim redom (Slika 54.). Kao što je ranije navedeno, u astrocitima nije nađen izraflaj *GAP43*, ni prije, ni nakon ishemijske lezije.



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



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



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

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

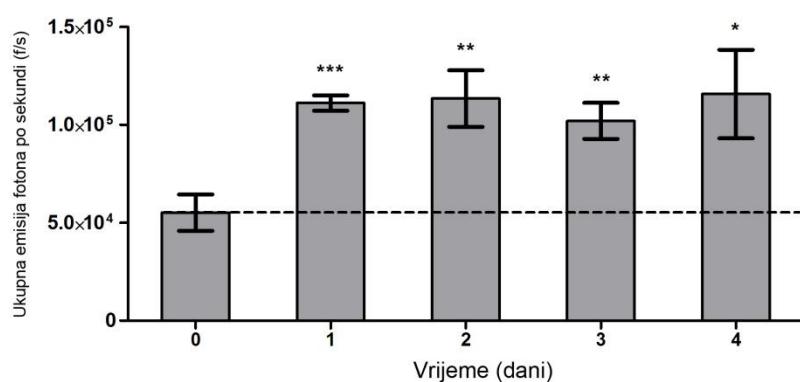
Kako bi se potvrdio ranije uspostavljeni protokol za praćenje izraflaja gena *Gap43*, korišten je bioluminiscentni segment reporterskog sustava, luciferaza, i ujma se prisutnost na razini gena potvrđuje genotipizacijom PCR-om (127).

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

Početne vrijednosti su snimljene za 4 mjeseca (55210 ± 9297 f/s), koji su potom podvrgnuti MCAO i redovito su svakodnevno primjenjivani kroz 4 dana (Slika 55.).

Vrijeme se 24 sata nakon ishemijskog održanja signal udvostručuje te je bio statistički značajno u odnosu na početne vrijednosti (111200 ± 3921 f/s, $P<0,0001$).

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



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

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

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

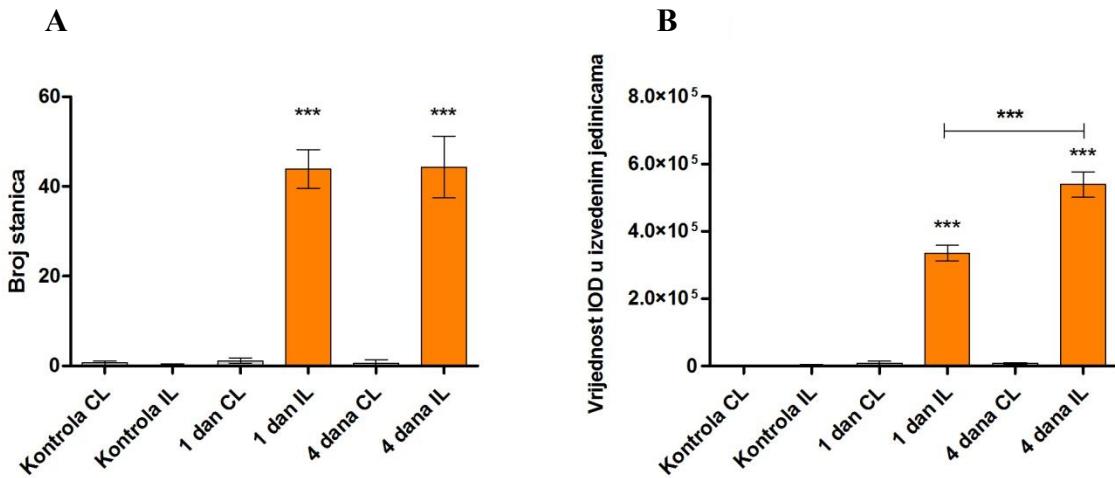
5.7.4. GAP43 i CASP3 su značajno kolokalizirani nakon ishemijskog oštećenja

Kvantifikacija broja stanica koje su istovremeno pozitivne na CASP3 i GAP43 pokazala je da njihov broj stastisti ki zna ajno ve i u odnosu na kontrole, obzirom da su u zdravom mozgu rijetko uo ene (1-2 po vidnom polju) (Slika 56).

Ve prvog dana nakon ishemije njihov je broj porastao na $43,9 \pm 4,4$ i 4. dana ostaje na toj razini $44,3 \pm 6,9$. Obzirom da je tijekom mikroskopiranja primje eno kako je signal za CASP3 neravnomjerno raspore en u svim stanicama u kojima je prisutan (za razliku od GFP-a koji uniformno boji cijeli neuron), bilo je potrebno provjeriti intenzitet izraflaja CASP3 mjeranjem integrirane opti ke gusto e.

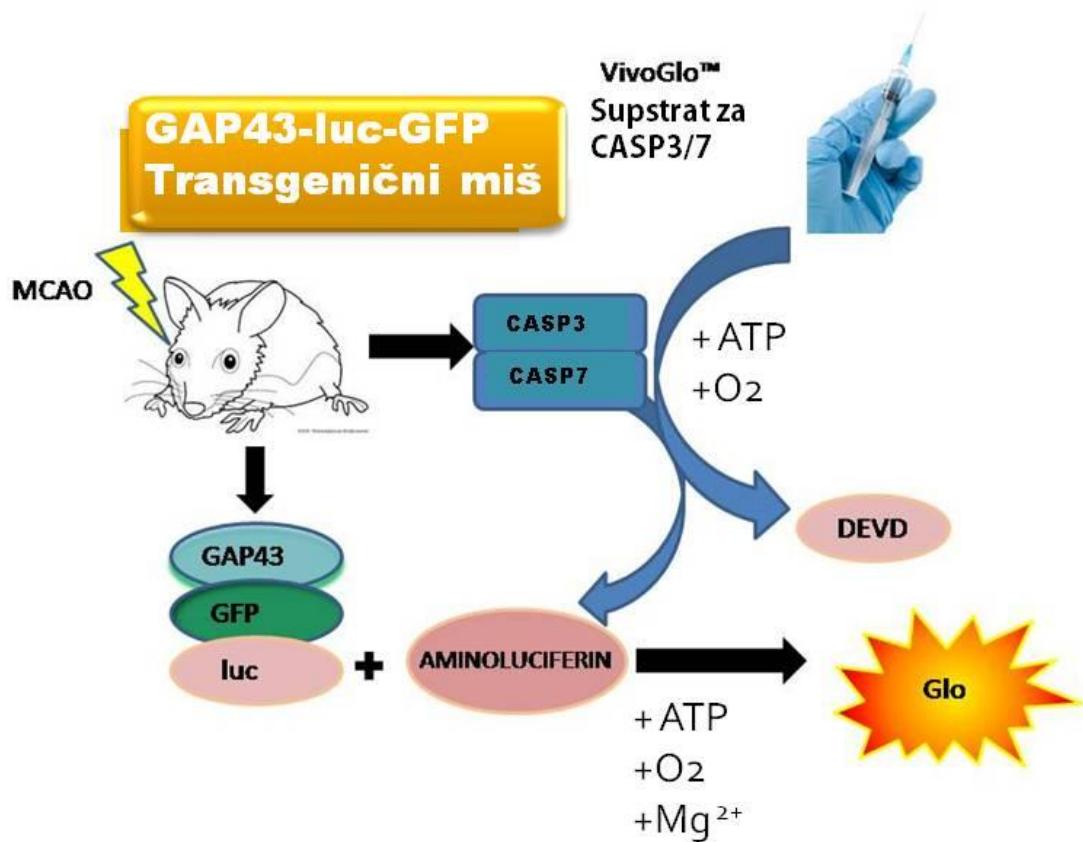
Mjerenje IOD-a pokazalo je pove anje signala koji se preklapa (CASP3 GAP43) u odnosu na po etne vrijednosti (ispilateralno $3.100, \pm 1200$, kontralateralno 3.500 ± 1.200) ve 24 sata nakon ishemijskog o-te enja (336.000 ± 22.000). Signal se prvog dana pove ao i u kontralateralnoj hemisferi, ali na samo 9.200 ± 5.800 . Nakon prvog pove anja od 1000 puta, signal se 4. dana jo-jednom udvostru io (540.000 ± 38.000).

Stoga iako izme u 1. i 4. dana nije do-lo do pove anog broja stanica koje pokazuju kolokalizaciju GAP43 i CASP3, mofle se zaklju iti kako 4. dan dolazi do unutarstani nog pove anja signala u stanicama koje su aktivirane u akutnoj fazi.



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

Uzimajući u obzir da je aktivna CASP3 cistein-aspartat proteaza, to je njen svojstvo iskoristivo u vidu cijepanja malih biomolekula koje potom postaju biološki aktivne. Razvijen je trfli-no dostupan supstrat natrijeva sol Z-DEVD-aminoluciferina (VivoGlo[®] Caspase-3/7 Substrate, Promega, Wisconsin, USA), koji nakon cijepanja s aktiviranom CASP3/7 oslobađa samostalan pentamer DEVD (D-Cist-Z-Asp-Glu-Val-Asp) i aminoluciferin. Na taj je način moguće pratiti izraflaj CASP3/7 u svim viabilnim stanicama koje istovremeno izraflavaju luciferin (Slika 57). Dok je CASP7 snadljivo zastupljena tijekom upale u stanicama mikroglije, CASP3 je dominantiji efektor kaskade kaspaza u neuronima te se signal dobiven na taj način u kulturama stanica ili *in vivo* može većinom pripisati CASP3 (177, 178).

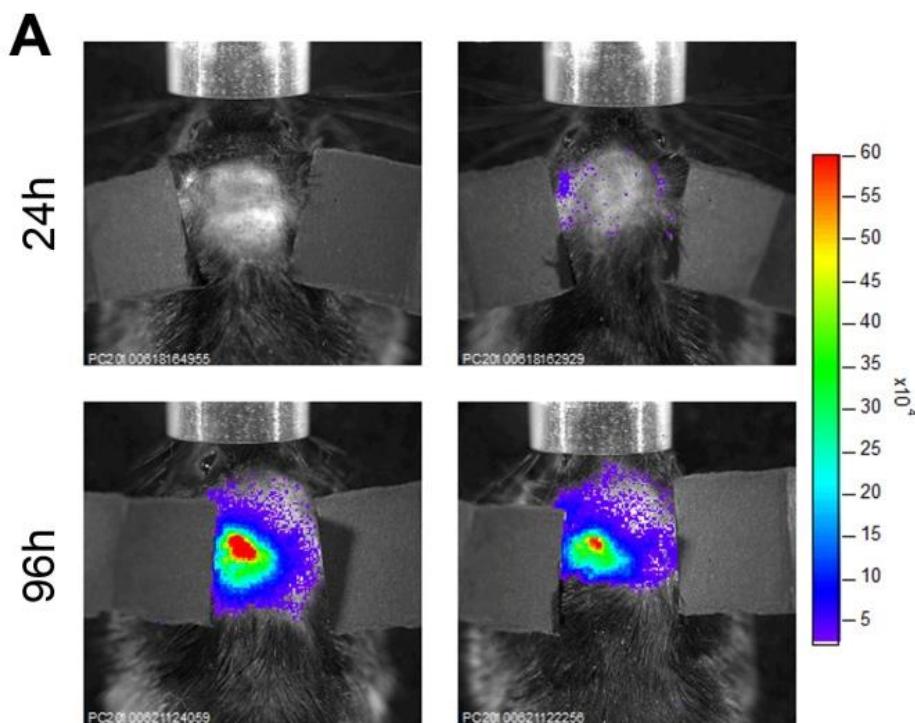


Slika 57. Shematski prikaz strategije pokusa sa VivoGlo™ supstratom. Nakon intraperitonealne injekcije dolazi do apsorpcije otopine cirkulaciju i njezine distribucije u mozak obzirom da prolazi krvno moždanu barijeru. Nakon ishemijskog oštećenja opsežna aktivacija CASP3 iz prokaspaze cijepa DEVD pentamer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

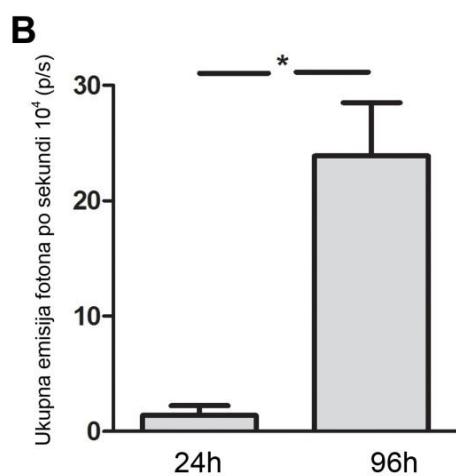
Koriste i 4 mi-a iz prethodnog pokusa u kojima se klasi nim D-luciferinom pokazalo da izraflavaju luciferazu potaknutu Gap43 promotorom, pristupilo se primjeni Z-DEVD aminoluciferina nakon -to je i- ezao prethodno postignuti signal (2 sata nakon snimanja).

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

Analiza bioluminiscencije primjenom supstrata VivoGlo[†] Caspase 3/7 pokazala je signal kolokalizacije koji se mogao kvantificirati (13.750 ± 8.640) već 1 dan nakon MCAO, a potom i statistički značajni porast intenziteta signala od gotovo 20 puta 4 dana nakon MCAO (239.000 ± 46.000 , $P=0,0406$) (Slika 58.).



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



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

6. RASPRAVA

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

Postupak prolazne okluzije sredi-nje mofldane arterije (MCAO) intraluminalnim filamentom je prema literaturi naj e- i model izazivanja ishemijskog o-te enja obzirom na svoju malu invazivnost (nije potrebna kraniotomija) i visoku reproducibilnost.

No, unato svim naporima za standardizaciju ishemijskog o-te enja, mjere i njegov volumen postoji relativno visoka standardna devijacija koja je prihva ena prilikom standardizacije modela od 40% veli ine samog o-te enja. Osim toga, nisu sve mofldane strukture jednako zahva ene kod svih mi-eva, te je potrebno potvrditi regionalnu raspodjelu ishemije nekom od metoda *in vivo* oslikavanja dobre prostorne razlu ivosti, koje su esto nedostupne za male glodavce.

Usprkos nabrojenim nedostacima, MCAO jo- uvijek prednja i pred svojim alternativama ukoliko je polje interesa molekularna analiza perilezionalnog korteksa unilateralnog flari-nog o-te enja.

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

Prilikom izolacije tkiva za Western blot u akutnim vremenskim to kama bojanje TTC-om mofle posluftiti kao orijentacija za prisutnost lezije, ali ne i za njenu kvantifikaciju. U kasnijim vremenskim to kama TTC nije koristan orijentir, ve tome sluffi prisutstvo offiljka ili morfolo-kog defekta zahva ene hemisfere.

Bojanje krezil violetom je iznimno koristan i jednostavna postupak koji se mofle provesti za sve uzorke namijenjene histolo-kim bojanjima, te osim utvr ivanja same prisutnosti o-te enja, ono omogu uje i njegovu kvantifikaciju.

Obzirom na veliku u estalost hidrocefala kod kori-tenog soja, pro-irenje studije MR oslikavanjem *in vivo* dalo bi presudan doprinos utvr ivanju po etnog stanja za flivotinje u ispitivanju te omogu ilo isklju ivanje onih s hidrocefalusom te identifikaciju onih s pove anjem likvorskih prostora nakon postupka MCAO.

Navedenim modelom, nakon uvodnog razdoblja uvježbavanja, postifle se zadovoljavaju e preflivljenje s iznimnom smrtno– u unutar 24 sata od zahvata, osobito ukoliko se radi o modelu s reperfuzijom koji je kori–ten u izradi ovog doktorata.

6.2. Odgodeni nastup senzo-motornih simptoma neurološkog oštećenja kod Tlr2-/ miševa u odnosu na miševe divljeg tipa

Testovi pona–anja predstavljaju najizravniju mjeru utjecaja neurolo–kog o–te enja na osjet i motori ke funkcije, kao i oporavka navedenih funkcija u razdoblju nakon MCAO kod mi–eva. Me unarodni konzorcij za ispitivanje fenotipova mi–eva dosad nije utvrdio osobitosti Tlr2-/– u odnosu na C57Bl/6, no razvidno je iz ranijih istraživanja (179), a i ovog provedenog u sklopu doktorata, kako postoje molekularne osnove za razlike u fiziolo–kim zbivanjima kod Tlr2-/– i mi–eva divljeg tipa osobito na temelju rezultata razli–itih izražaja gena uklju–enih u signalni put TLR2 (116).

injenica da se ne radi o uvjetovanom isklju–ivanju gena (*engl. conditional knock out*) kojim bi se pojedini gen proizvoljno isklju–io nakon –to je njegova dotada–nja funkcija bila normalna i tijekom razvoja i tijekom odrasle dobi, ostavlja mogu–nost utjecaja trajnog isklju–ivanja *Tlr2-/–* gena na po etno stanje mi–eva koji ga ne posjeduju, ali i na njihovo pona–anje u odrasloj dobi te starenju.

Stoga je bilo potrebno sva ispitivanja pona–anja provoditi s dovoljnim brojem lafno operiranih mi–eva Tlr2-/– genotipa kao kontrola koje bi ukazale na unaprijed postoje e razlike izme u njih i mi–eva divljeg tipa.

Takve su se blage, ali uo–jive unaprijed postoje e razlike pokazale u tjelesnoj teflini i njenim promjenama mjesec dana nakon laflog zahvata, odnosno u dobi od 4 mjeseca kad lafno operirani mi–evi divljeg tipa nastavljaju vi–e dobivati na teflini, u usporedbi sa svojim Tlr2-/– parovima. Tlr2-/– mi–evi u dobi od 4 mjeseca pokazuju i blago smanjenje koli–ine kretanja –to se o ituje 28.dana ispitivanja nakon zahvata u ukupnom broj kretanja u Schallertovom cilindru te duljini održavanja na ubrzavaju em rotarodu. Kako navedene razlike nisu statisti ki zna–ajne na kori–tenoj veli–ini uzorka, sve bi statisti ki zna–ajne razlike nastale nakon MCAO ukazivale na presudan utjecaj manjka TRL2 isklju–ivo nakon ishemijskog o–te enja.

Neurolo–ki deficit se pokazao kao osjetljiva mjera za prisutnost ishemijskog o–te enja, ali nije bio dovoljno osjetljiv da na ispitivanoj veli–ini uzorka prikafle zna–ajne promjene u odnosu na genotip, kao –to je uo–eno kod ranije provedenih istraživanja (121).

Osjetljivost neurolo–kog deficita ovisi o subjektivnom pristupu zasljepljenog ispitiva a te zbog svog kratkog trajanja i malog opsega promatranja zahtjeva primjenu dodatnih testova

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

Promatraju i grube parametre motori ke aktivnosti pomo u rotaroda i Schallertovog cilindra uo ava se odgo en razvitak motori kog o-te enja kod kod Trl2/- mi-eva s MCAO, koji se pri tom i nastavlja u kroni nu fazu oporavka.

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

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

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

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

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

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

6.4. Asimetrija neuralne mreže u podlozi neuroloških simptoma

Promatraju i neuralnu mreflu pomo u YFP-a potaknutog Thy1 promotorom u kroni noj vremenskoj to ki od 28 dana nakon ishemiskog o-te enja, kod mi-eva divljeg tipa nije uo ena razlika u opti koj gusto i izme u zahva ene i nezahva ene mofldane polutke, dok je zahvaljuju i blagom porastu IOD-a u nezahva enoj polutki te blagom padu IOD-a u zahva enoj polutki kod flivotinja bez TLR2 nastupila asimetrija sastavnica neuralne mrefle. Takav nalaz odraflava prezistenciju neurolo-kih simptoma kod Tlr2-/ mi-eva koji su pak mnogo izrafleniji od samog histolo-kog supstrata. Stoga je bilo potrebno analizirati dodatne parametre poput utjecaja TLR2 na apoptotski put koji utje e poglavito na brojnost neurona, te utjecaja TLR2 na izraflaj bjelan evina sinapsi.

6.5. TLR2 dijeli signalni put s drugim receptorima upale

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

Stoga je bilo mogu e pratiti utjecaj manjka TLR2 na njegov vlastiti izraflaj.

Obzirom da se kod Tlr2-/ bazalne razine mRNA za TLR2 nisu promijenile, moze se zaklju iti kako u samom signalnom putu ne postoji potreba za nadoknadom neaktivnog receptora putem njegovog poja anog izraflaja.

Dinamika izraflaja *Tlr2* je ranije opisana kod mi-eva s funkcionalnim TLR2 putem *in vivo* oslikavanja bioluminiscencije luciferazom potaknutom *Tlr2* promotorom transgeni nih *Tlr2-luc/gfp* mi-eva (62).

U ovom istraflivanju potvr ena je identi na dinamika izraflaja *Tlr2* s akutnim porastom unutar 72 sata i maksimalnom vrijedno– u tjedan dana nakon ishemije.

No, prate i izraflaj *Tlr2* kod Tlr2-/ mi-eva nakon ishemiskog o-te enja nije uo ena kompenzacija kroz snafnije prepisivanje *Tlr2*, ve upravo suprotno, odgovor izraflajem *Tlr2* bio je nifli.

To je dovelo do zaklju ka da izraflaj *Tlr2* ne ovisi o prisutstvu djelatne bjelan evine TLR2, ve o samom signalnom putu TLR2.

Receptori nalik na Toll (TLR-ovi) su općenito odgovorni za slofenu signalnu mrežu u imunitetu, te me usobno ispreplitanje signalnih putova različitih TLR-ova određuje razmjer i vrstu imunološkog odgovora.

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

Upravo iz tog razloga iščekujuće išvanje *Tlr2* gena nije u potpunosti dokinulo njegov signalni put, te je ostala očuvana pozitivna povratna sprega puta ovisnog o *Tlr2* i njegovog izrafljaja.

Obzirom da je ipak TLR2 glavni okidač tog puta, ostali aktivirajući signali (TLR4) nisu bili dovoljni da razina odgovora dostigne razine prisutne kod WT miševa nakon ishemijskog otevrenja.

Ikakve su bazalne razine skraćene mRNA *Tlr2* kod *Tlr2-/-* miševa ostale iste, izraflaj mnogih ispitanih gena signalnog puta TLR2 izmijenio je svoju bazalnu razinu kod *Tlr2-/-*, uključujući i: *MyD88*, *Irak1*, *Irak4*, *Ikbkb*, *Irak3*, *Tollip*, *Tnf*, *Il6* i *Casp8*.

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

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

6.6. Adapterska bjelančevina MyD 88 nadoknađuje manjak TLR2

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

Izraflaj *Myd88* se povećao kod miševa divljeg tipa nakon ishemijskog otevrenja, no taj odgovor nije bio enak kod *Tlr2-/-* miševa. Pri tom je i razina *Myd88* kod *Tlr2-/-* miševa bila bazalno povećana.

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

Slično kao i kod MyD88, odgovor nakon ishemije je izostao kod apoptotičkih imbenika FADD-a. On se povezuje s MyD88 svojom domenom za usmjerivanje te predstavlja posrednika između puteva imuniteta i apoptoze (118).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6.8. Manjak TLR2 dovodi do povećanja CASP8

Nasuprot tom smanjenju izraflaja mRNA predstavnika upale (*Tnf*), *Casp8* je, kao predstavnik apoptoze, pokazao ve i izraflaj kod *Tlr2*-/- u usporedbi s WT, osobito tijekom kroni ne faze oporavka.

Novije analize *Tlr2*-/- mi-eva potvr uju da iako su akutna ishemijska o-te enja (24-72h) bila manja nego li kod WT mi-eva, infarcirani volumeni su bili ve i 7 dana nakon MCAO, kao i apoptiza neurona bez TLR2 (121).

Iako se smatra da manjak TLR2 uzrokuje manju upalu, -to dovodi do pove anog izraflaja *Casp8*, poja ane apoptoze u odgo enim vremenskim to kama te kasnijeg posljedi nog pove anja volumena o-te enja, mogu a su i druga obja-njenja uzro no posljedi ne povezanosti navedenih doga aja. Primjerice, izravan utjecaj manjka TLR2 na apoptizu i/ili odgoda u nastupu o-te enja.

Prikazani podaci, zajedno s ranijim istraflivanjima nagla-avaju kako optimalan i vremenski odre en imunolo-ki odgovor utje e na apoptizu te je nuflan kako bi ograni io o-te enje neurona nakon mofldanog udara.

6.9. Manjak TLR2 povećava izražaj biljega sinapsi i neuralnog stresa

Promatralju i razine bjelan evina koje su biljezi sinapsi, aksona i neuralnog stresa, pokazalo se kako je unato manjoj gusto i neuralne mrefle u korteksu ipsilezionalne hemisfere, koli ina sinapti kih bjelan evina u kroni noj vremenskoj to ki od 28 dana zna ajno ve a kod *Tlr2*-/- mi-eva. Takav bi nalaz trebalo istrafliti na razini morfometrije neurona kod *Tlr2*-/- mi-eva prije i nakon ishemijskog o-te enja te bi samo rezultati na razini pojedinih stanica mogli objasniti radi li se o pove anom broju sinapsi po pojedinom ogranku neurona ili su ogranci brojniji i kra i te ne sadrfle mnogo citoskeleta na iju pregradnju utje e GAP43.

Promatralju i GAP43 biljeg, pokazalo se kako on kod mi-eva divljeg tipa na razini bjela nevine uistinu prati dinamiku izraflaja prikazanu bioluminiscencijom u prethodnim istraflivanjima (127), no ona je kod *Tlr2*-/- izmijenjena s naglim pove anjem mjesec dana nakon ishemijskog o-te enja.

No, istovremeno je prisutna i statisti ki zna ajno ve a koli ina CASP3 koja, izme u ostalog, odraflava i put CASP8 za iju mRNA je u pokusu real time rtPCR-a identificirano kako se pove ava kod *Tlr2*-/- mi-eva nakon ishemijskog o-te enja (190).

Obzirom da manjak TLR2 utječe najintenzivnije upravo na CASP3, ta bi bjelan evina mogla posluftiti kao pokazatelj neuralnog stresa ukoliko se uspostavi model u kojem će se selektivno moći prikazati populacija neurona, a to je upravo model transgeni nih Gap43-luc/gfp mi-eva.

6.10. Koordinacija GAP43 i CASP3 u regulaciji oporavka nakon ishemiskog oštećenja

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

Kod odraslih sisavaca nakon ozljede moždane kore dolazi do odgovora pomoći u pupanja aksona, pri čemu je GAP43 najintenzivnije izraflena bjelan evina koja promiče rast(138, 145, 191, 192). Kod glodavaca s MCAO, GAP43 je prisutan tijekom rane faze u flaku ishemiskog oštećenja, a potom u penumbri(192). To upućuje na ranu ulogu bjelan evine GAP43 u spaavanju i regeneraciji tkiva. Kod trajne okluzije MCA, kad je oštećenje uslijed izostanka reperfuzije veće, GAP43 ne postoji u njenom flaku, no izraflaj mu je povećan doseflu i svoj maksimum 7 dana nakon ishemije (193).

Rasvjetljavanje uloge GAP43 je napredovalo nedavnim otkrićem kako je GAP43 prisutan i na postsinaptičkim membranama moždane kore predstavljati supstrat za CASP3(143, 144). Postsinaptička lokacija bjelan evine GAP43 premjestila je težiće u razumijevanju njegove uloge s mehaničke elongacije staničnih nastavaka prema sloflenjem podiavanju unutarstanih mreža potrebnih za oporavak tkiva.

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

To je dodalo novu dimenziju razumijevanju regeneracije nakon ishemiskog oštećenja: stani na smrt je blisko povezana s produljavanjem novih staničnih nastavaka i finim podiavanjem novostvorenih mestnostinih vezova. Integrirajući navedene nove spoznaje, pretpostavljen je kako su CASP3 i GAP43 uključeni u zajednički put tijekom ranog odgovora nakon ishemiskog oštećenja.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali kako se i GAP43 i CASP3 brzo i znakovito povećavaju u tkivu nakon MCAO te da su taj povećanjem u pozitivnoj linearnoj koleraciji. Obzirom da je upala u središnjem mozgu anomalskom sustavu vrlo slofloeno, jedinstveno i težko reproducibilno zbivanje, bilo je potrebno svesti varijabilnost na najmanju moguću mjeru.

Neinvazivno pranje bioluminiscencijom omoguilo je ponovne procjene lokalizacije i kvantifikacije staničnog signala na istim flivotinjama.

Pojedini signal za GAP43 i CASP3 dobiven bioluminiscencijom je detaljno poduprт metodama imunohistokemije. Analiza je pokazala da povećanje intenziteta signala za GAP43 i CASP3 nije nastupilo uslijed povećanja broja stanica koje izraflavaju obje bjelanevine.

Takav nalaz navodi na zaključak da *Gap43* i *Casp3* pripadaju genima aktiviranim u najranijem stadiju nakon nastupa ishemijskog otevrenja te da su stanice uključene u regenerativna zbivanja one koje posjeduju izraflaj oba gena, što je u suprotnosti s apoptozom.

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

Četiri dana nakon ishemijskog otevrenja uslijedilo je povećanje i količine CASP3, no bez dodatnog povećanja broja stanica, što je imalo za posljedicu povećanu kolokalizaciju.

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

6.11. Snimanje bioluminiscencije pomoću prosubstrata za luciferazu predstavlja neinvazivno utvrđivanje biomarkera upale i pregradnje

Iako navedeni procesi nisu još u potpunosti razvidni, možemo prepostaviti model u kojem GAP43 djeluje kao rani signal za aksonogenezu nakon čega slijedi povećanje količine CASP3 koja u ovom slučaju ne djeluje proapoptotski, već kao molekula koja kontrolira vbjelanje evina GAP43 kao svoj substrat.

Kolokalizacija unutar istog neurona ukazuje na važnost navedenih biljega u finom podeavanju produžavanja aksona i reorganizacije citoskeleta, kao glavnim sastavnicama regeneracije središnjeg fliva anoga sustava.

Praćenje njihove kolokalizacije neinvazivnom bioluminiscencijom predstavlja uvid u prostorno-vremenska zbivanja unutar mozga eksperimentalne flivotinje te time omogućuje primjenu potencijalno terapijskih postupaka i lijekova u specifično definiranom trenutku, obzirom da i djelovanje pojedinih terapeutika usko zavisi o fazi odvijanja ishemijskog otevrenja.

6.12. Odrednice za buduća istraživanja urođene imunosti nakon moždanog udara

6.12.1. Nedostaci provedenog znanstvenog istraživanja

Metoda izazivanja ishemiskog o-te enja putem MCAO kao standardizirani postupak ipak u sebi sadrži varijabilnost zahva enih podru ja mozga koja ponekad osim mofldane kore uklju uju hipokampus, amigdale i striatum u razli itoj mjeri. Takva odstupanja moflda odraflavaju mofldani udar prisutan kod ovjeka, no oteflavaju usporedbu prilikom provo enja testova pona-anja.

Stoga je potrebno, pored kontrole protoka kroz teritorij MCA pomo u MCAO, uvesti metode in vivo oslikavanja lezije visoke prostorne razlu ivosti koja bi omogu ila specifi ne zaklju ke testova pona-anja, ali i koregistraciju s drugim modalitetima in vivo oslikavanja koji ne podrflavaju takvu razlu ivost.

Primjena TTC bojanja ograni ena je samo na prva 3 dana nakon ishemiskog o-te enja, nako ega radi dolaska flih upalnih stanica na mjesto ishemije prestaje postojati o-tri granica koja do tad dijeli tkivo bez aktivnih dehidrogenaza iji je TTC supstrat.

Stoga je potrebno sve uzorke mi-jih mozgova prire ene za imunohistokemiju analizirati pomo u bojanja krežil violetom. To nije bilo mogu e na svim uzorcima u ovom istraflivanju jer se tkivo mozga za odre ivanje razina bjelan evina i mRNA usitnjuje odmah po izolaciji.

Obzirom da TLR2 posreduje u upali koja mofle biti izazvana egzogenim imbenicima, svaka epidemija zaraze u flivotinjskoj nastambi se odraflava na njegovu aktivaciju. Kako bi se izbjegli takvi izvanjski utjecaji na rezultate, bilo je potrebno istovremeno imati dovoljan broj kontrolnih flivotinja koje bi sluhile kao pokazatelj promjena u okoli-u. Kako to nije uvijek mogu e radi ograni enog broja flivotinja, pobolj-anje uvjeta u flivotinjskoj nastambi predstavljaljalo bi klju ni imbenik dalnjeg prouavanja imunolo-kih zbivanja kod mi-eva.

Procjena neurolo-kog statusa prema Garcii se nije pokazala dovoljno osjetljivom za uo avanje senzo-motori kih simptoma koji su utvr eni drugim testovima. Ukoliko bi se provodila kao samostalna metoda bihevioralne procjene neurolo-kog o-te enja bez dodatnog pro-irenja promatranja s parametrima izgleda i dugotrajnijeg promatranja koje bi uo ilo eventualne epilepti ke napade, te, mogla bi polu iti velik broj lafno negativnih rezultata.

Broj flivotinja uklju enih u ispitivanje testova pona-anja onemogu avao je provo enje ispitivanja anksioznosti, emocionalnosti i radnog pam enja (Y-labirint, otvoreno polje), obzirom da ona zahtijevaju u slu aju mi-a kao eksperimentalne flivotinje najmanje 15 mi-eva po ispitivanoj skupini kako bi se donijeli valjani zaklju ci (194).

Prikaz neuralne mrefle omogu uje uvid u sveukupnu koli inu tijela neurona i njihovih nastavaka, no za preciznije utvr ivanje aksonalnog urastanja bilo bi potrebno koristiti specifi ne biljege aksona te po mogu nosti mjeriti njihovo urastanje iz kontralateralne hemisfere –to se postife stereotaksijskom injekcijom biljega koji anterogradno putuju aksonima, kao –to su dekstran amini obiljefleni nekom od fluorescentnih proba.

U pokusu brojanja GAP43 pozitivnih stanica kori–ten je GFP kao neizravni fluorescentni reporter za prisutnost bjelan evine GAP43. Kako god, GFP se nakuplja u stanici i sporije razgra uje od samog GAP43 te dobiveni signal ne mora u potpunosti odraflavati trenutan, ve ukupni izraflaj GAP43 u flivotu svake pojedine stanice. Stoga bi preciznije bilo mjeriti GAP43 na histolo–kim rezovima protutijelima specifi nim za navedenu bjelan evinu, a GFP koristiti samo kao orijentir za stanice u kojima o ekujemo signal.

6.12.2. Odrednice za buduća istraživanja

U skladu s navedenim nedostacima provedenog istraflivanja, daljnja istraflivanja na polju uro ene imunosti koja uklju uju izazivanje ishemijskog o–te enja pomo u MCAO, trebala bi sadrflavati neko od *in vivo* oslikavanja visoke prostorne razlu ivosti, kao –to su to magnetna rezonancija i mikro-kompjuterizirana tomografija kako bi se omogu ilo razlikovanje flivotinja kojima su zahva ene razli ite regije mozga.

Unaprje enje uvjeta u flivotinskoj nastambi do razine slobodne za specifi ne patogene (*engl. Specific Pathogen Free, SPF*) isklju ivalo bi utjecaj vanjskih aktivatora receptora uro ene imunosti, te bi bio potreban manji broj flivotinja kao kontrola, a k tome bi se povisilo i preflivljenje flivotinja nakon MCAO obzirom da ne bi bile optere ene prate om infekcijom (195).

Uklju ivanje ve eg broja mi–eva u skupine za ispitivanje pona–anja presudno je za stjecanje zaklju aka o njihovom radnom pam enju, anksioznosti i emocionalnosti koja mogu tako er biti pod utjecajem signalnog puta TLR-ova. Stoga je za budu a ispitivanja, osim probira flivotinja sa zahva enim regijama amigdale i hipokampa za navedene pokuse, potrebno formirati dovoljno velike skupine za ispitivanja poput Y-labirinta i otvorenog polja.

Prilikom posredne analize izraflaja gena od interesa putem sustava reporterske bjelan evine GFP-a, potrebno je uzeti u obzir njeno dugo vrijeme poluflivota te ga usporediti sa signalnom dobivenim specifi nim protutijelima za bjelan evinu od interesa. U suprotnom bi dobivene rezultate moglo biti te-ko tuma iti samo na temelju unutarstani nog nakupljanja GFP-a.

Obzirom na korisnost primjene prosubstrata za luciferazu u obliku Z-DEVD-aminoluciferina za orijentaciju u upalnim zbivanjima nakon ishemiskog o-te enja kod GAP43-luc/gfp mi-eva, daljnji bi smjer istraflivanja svakako uklju ivao primjenu istog postupka kod flivotinja koje imaju isklju en Tlr2 gen, odnosno na kriflanom soju izme u *Gap43/luc/GFP* i *Tlr2-/- mi-eva*.

Kako se bioluminiscencija pokazala iznimno jednostavnom i brzom metodom za pra enje izraflaja gena od interesa, njena budu a primjena uklju uje:

- stvaranje novih transgeni nih flivotinja po pitanju gena od interesa;
- stvaranje novih transgeni nih flivotinja s novim cilnjim enzimima;
- pra enja dinamike izraflaja nakon drugih oblika neurolo-kih o-te enja;
- stvaranje i razvoj novih prosupstrata i supstrata za ciljne bioluminiscentne enzime;
- razvoj novih pristupa u oslikavanju bioluminiscencije.

Kao metoda probira budu ih ciljnih molekula u istraflivanju mofldanog udara idealnom se pokazala tehnologiju DNA mikro ipa koja omogu uje pra enje diferencijalnog izraflaja na tisu e gena. Tako je, primjerice, dobiven uvid u poja avanje i uti-avanje izraflaja pojedinih gena po vremenskim to kama nakon ishemiskog o-te enja: 30 minuta unutar nastupa ishemije bili su poja ani geni neposrednog ranog odgovora (*engl. immediate early genes*), geni transkripcijskih faktora i bjelan evina toplinskog -oka (*engl. heat shock proteins, HSPs*). Slijedilo je poja avanje gena upale (primjerice imbenika aktivacije trombocita, *engl. platelet-activating factor, PAF*; imbenika nekroze tumora- , *engl. tumor necrosis factor- α, TNF- α*; i interleukin 1- , IL- 1), apoptoze, citoskeleta i metabolizma s vrhuncem izme u 4-24 sata. Neurotropni imbenici su pokazali odgo eno poja avanje s po etkom od 24h i trajanje do 7 dana nakon ishemije. Utu-ani su bili geni ionskih kanala i receptora za neurotransmitere unutar 8-24 sata, a potom su geni sinapti kih bjelan evina bili utu-ani 3-7 dana nakon MCAO (196).

Rezultati dobiveni tehnologijom oligonukleotignih mikro ipova imaju svoja ograni enja prilikom longitudinalnog pra enja izraflaja gena u vi-e vremenskih to aka, poglavito jer se

oslanjaju na promjene u odnosu na niske bazalne vrijednosti te je, u slučaju unaprijed prisutne mRNA, moguća pogrešna interpretacija rezultata (197).

Uobičajeno je potvrditi rezultate nekom od neovisnih tehnika poput RT-PCR-a, Northern blota ili Western blota. Pri tom se ne mogu svi geni analizirati svakom metodom verifikacije, jer sve potrebne sastavnice ne moraju biti dostupne, kao što su monoklonska protutijela potrebna za Western blot ili oznake po etnici za RT-PCR (198).

Složeni mehanizam upalnih zbijanja nakon nastupa ishemije ostavlja prostora za istraživanje njegove orkestracije od razine gena, preko mRNA, morfologije neurona, integracije mofldane kore pa sve do neuroloških simptoma i njihovog povlačenja.

6.12.3. Translacijska vrijednost istraživanja

Rezultati ispitivanja naglašavaju kako je za oporavak nakon ishemijskog otečenja potreban funkcionalan i pravovremeni upalni odgovor. Posljedica takvog odgovora je ograničavanje napredovanja otečenja, te poticanje neuroregenerativnih mehanizama za što brže ponovnu uspostavu neuronske mreže. Takva uloga imunoloških zbijanja, pokazuje da postishemijska upala nema jednoznačno negativan predznak.

Obzirom na zaključak kako TLR2 dijeli svoj signalni put s drugim receptorima, preporučuje se višedimenzionalnost terapijskog pristupa koji bi, osim agonista/antagonista jedne molekule, trebao u pravilno vremenski odnos, enim prozorima ciljati na više potencijalnih imbenika koji bi istovremeno umanjivali apoptozu, a održavali ili pojavačili pregradnju neuronalnih nastavaka.

Iako se MyD88 pokazao kao integrator signalnih putova za TLR2 i TLR4, sve posljedice njegovog trajnog isključivanja još nisu razjašnjene.

Doprinos ovog znanstvenog istraživanja u pogledu kliničkog pristupa predstavlja tkivno-molekulski temelj za pozitivna zbijanja u postishemijskoj upali, osobito u kasnijim fazama nakon nastupa ishemijskog otečenja, kad bi dokidanje djelovanja TLR2 receptora usporilo oporavak neuroloških simptoma.

7. ZAKLJUČAK

7.1. OPĆI ZAKLJUČAK

Djelovanje TLR2 nakon ishemijskog o-te enja mi-jeg mozga poti e funkcionalni oporavak i ranu reaktivnu sinaptogenezu. Kod mi-eva divljeg tipa (C57Bl/6) u odnosu na mi-eve s onemogu enim *Tlr2* genom, nastup o-te enja je raniji i opsefniji, no i sam oporavak zapo inje bez odgode prisutne kod *Tlr2*-/- mi-eva, dok se kod *Tlr2*-/- oporavak odga a i trajanje o-te enja se produljuje.

7.2. SPECIFIČNI ZAKLJUČCI

- I. Funkcionalni oporavak kod *Tlr2*-/- mi-eva nastupa kasnije i njegovo se trajanje produljuje u odnosu na mi-eve divljeg tipa. To navodi na zaklju ak kako je TLR2 vaflan za dinamiku upale, intenziviraju i je i dovode i do njene brfle rezolucije.
- II. Reaktivna sinaptogeneza je pove ana u kroni nom stadiju oporavka (28 dana) nakon ishemijskog o-te enja u mi-jem mozgu kod *Tlr2*-/- mi-eva u odnosu na mi-eve divljeg tipa. To navodi na zaklju ak da uro ena imunost ima ulogu u procesu sinaptogeneze u kroni noj fazi oporavka nakon mofldanog udara.
- III. Gusto a neuralne mrefle u kori zahva ene polutke mi-jeg mozga nakon MCAO u kroni nom stadiju oporavka (28 dana) nakon ishemijskog o-te enja je smanjena kod mi-eva s onemogu enim *Tlr2* genom u odnosu na mi-eve divljeg tipa.
- IV. Usporeno je sazrijevanje krvnih flila te je smanjen broj njihovih grananja u kori zahva ene polutke mi-jeg mozga nakon MCAO u kroni nom stadiju oporavka (28 dana) nakon ishemijskog o-te enja kod mi-eva s onemogu enim *Tlr2* genom u odnosu na mi-eve divljeg tipa
- V. GAP43 i CASP3, zbog svoje izraflenosti u o-te enom mofldanom tkivu, predstavljaju biolo-ke odrednice intenziteta upalnih zbivanja nakon ishemijskog o-te enja.

8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU

ULOGA TLR2 U MODULACIJI SINAPTIKE PLASTIČNOSTI I OPORAVKA POSLIJE ISHEMIJSKOGA OTTEŠENJA MlJEGA MOZGA

Dunja Gorup, 2016.

Osnovne odrednice postishemijske upale su signalni putovi urovine imunosti, od kojih su se najzastupljenijim pokazali putovi ovisni o TLR2 izrafljenim na stanicama mikroglijе.

S ciljem određivanja djelovanja TLR2 na funkcionalni oporavak i reaktivnu sinaptogenezu, provedeno je istraživanje na modelu ishemijskog otešenja mi-jeg mozga s onemogućenim *Tlr2* genom (*Tlr2-/-*) pomoću okluzije srednjeg mofldane arterije (*engl. Medial Cerebral Artery Occlusion, MCAO*) -to je omogućilo promatranje postishemijskih zbivanja na razini izraflaja mRNA, bjelančevina i struktura tkiva te njihovog odraza na neurološke simptome.

Funkcionalno otešenje je mjereno testovima ponašanja kod *Tlr2-/-* mi-eva nastupa kasnije i u blaflem obliku, te se njihov oporavak produljuje u odnosu na mi-eve divljeg tipa (*engl. Wild Type, WT*). Metodom qPCR-a uverenje su promjene količine izraflaja gena signalnog puta TLR2: *MyD88*, *FADD* i *Casp8*.

Western Blot za biljege sinapsi (DLG4, sinaptofizin) i biljege aksonogeneze (GAP43) pokazao je promijenjen profil izraflaja u akutnoj fazi te značajni porast mjesec dana nakon ishemije kod *Tlr2-/-* u odnosu na WT mi-eve.

Gustoća neuralne mrefle bila je smanjena kod *Tlr2-/-* mi-eva u odnosu na WT kontrole, kao i broj grananja krvnih filala sa sporijim sazrijevanjem mikrovaskularne mrefle.

Utvrđeno je kako TLR2 utječe na dinamiku postishemijskog oporavka zajedno s neurološkim simptomima. Stoga terapijski potencijal leži u pravodobnoj modulaciji TLR2 odgovora. Pri tom je terapijski prozor moguće odrediti pomoć u biljega neuralnog stresa CASP3 i GAP43.

9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU - SUMMARY

THE ROLE OF TLR2 IN SYNAPTIC PLASTICITY AND FUNCTIONAL RECOVERY AFTER ISCHEMIC LESION OF MICE BRAIN

Dunja Gorup, 2016

Postischemic neuroinflammation depends on innate immunity that is predominantly relying on the TLR signaling.

To determine the role of TLR2 on the functional recovery and reactive synaptogenesis, research was conducted inducing ischemic brain lesions (MCAO) in mice lacking the *Tlr2* gene investigating postischemic events at the level of mRNA and protein expression, angiogenesis, neuronal network and neurological symptoms.

Functional deficits had later and more mild onset in *Tlr2*-/- mice and also displayed a prolonged chronic phase of recovery compared to wild type (WT). qRT-PCR revealed an increase in the mRNA expression of several components of the TLR2 signalling: MyD88, FADD and CASP8.

Western blot of synaptic markers (DLG4, synaptophysin) and a marker of axonogenesis (GAP43) revealed their changed profile in the acute phase and a significant increase in their expression 1 month after ischemia in *Tlr2*-/- mice compared to their WT controls.

Neuronal network density was lower in *Tlr2*-/- mice and they showed slower maturation of the microvascular network with lesser bifurcations, compared to the WT mice.

TLR2 was shown to influence the dynamics of postischemic recovery indicating a therapeutic potential of timed modulation of the TLR2 response. The therapeutic window can be determined using colocalisation of CASP3 and GAP43.

10. POPIS LITERATURE

1. World Health Organisation. *Cerebrovascular Disorders (Offset Publications)*. 1978.
2. Donnan, G.A. et al. *Stroke*. Lancet, 2008. 371(9624): 1612-23.
3. World Health Organisation. *International Classification of Diseases (ICD)*. 1990; Dostupno na: <http://www.who.int/classifications/icd/en/>.
4. World Health Organisation, C.f.D.C. *Atlas of Heart Disease and Stroke*. 2012.
5. Worlh Health Organisation *Deaths from stroke*. 2015; Dostupno na: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_16_death_from_stroke.pdf?ua=1.
6. Seshadri, S. et al. *The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study*. Stroke, 2006. 37(2): 345-50.
7. Feigin, V.L. et al. *Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2014. 383(9913): 245-54.
8. Zdravstvo, H.Z.Z.J. *Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2014. godini*. 2015; Dostupno na: http://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/umrli_20141.pdf.
9. Smajlovic, D. B. Kojic, et O. Sinanovic, *Five-year survival-after first-ever stroke*. Bosn J Basic Med Sci, 2006. 6(3): 17-22.
10. Kralj V, H.-fi.V. *Javnozdravstveni značaj kardiovaskularnih bolesti*. Kardio list, 2009. 3: 73-76.
11. World Health Organisation. *Economic Costs*. 2014; Dostupno na: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_17_economics.pdf?ua=1.
12. Thrift, A.G. et al. *Global stroke statistics*. Int J Stroke, 2014. 9(1): 6-18.
13. World Health Organisation *Estimated Deaths By Cause*. 2014; Dostupno na: <https://docs.google.com/spreadsheets/d/1XiJAJiNFiEdIwtqm6xaCtU96m1DfPef8ieRHN2WmOVY/edit>.
14. Menken, M. T.L. Munsat, et J.F. Toole, *The global burden of disease study: implications for neurology*. Arch Neurol, 2000. 57(3): 418-20.
15. Rothwell, P.M. *The high cost of not funding stroke research: a comparison with heart disease and cancer*. Lancet, 2001. 357(9268): 1612-6.
16. Tracey, J.A. et al. *Mapping behavioral landscapes for animal movement: a finite mixture modeling approach*. Ecol Appl, 2013. 23(3): 654-69.
17. Stroke Therapy Academic Industry, R. *Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development*. Stroke, 1999. 30(12): 2752-8.
18. Macrae, I.M. *New models offocal cerebral ischaemia*. Br. J. clin. Pharmac. 1992. 34: 302-308.
19. Casals, J.B. et al. *The use of animal models for stroke research: a review*. Comp Med, 2011. 61(4): 305-13.
20. Garosi, L.S. et J.F. McConnell, *Ischaemic stroke in dogs and humans: a comparative review*. J Small Anim Pract, 2005. 46(11): 521-9.
21. Bacigaluppi, M. G. Comi, et D.M. Hermann, *Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia*. Open Neurol J, 2010. 4: 34-8.
22. Daniel I Slater, S.C.G. Tonya Marie Cook, Kristen L Burnham. *Middle Cerebral Artery Stroke*. Medscape 2015; Dostupno na: <http://emedicine.medscape.com/article/323120-overview>.
23. Yuan, F. et al. *Optimizing suture middle cerebral artery occlusion model in C57BL/6 mice circumvents posterior communicating artery dysplasia*. J Neurotrauma, 2012. 29(7): 1499-505.
24. Flecknell, P. *Replacement, reduction and refinement*. ALTEX, 2002. 19(2): 73-8.
25. Belayev, L. et al. *Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model*. Stroke, 1996. 27(9): 1616-22; discussion 1623.
26. Koizumi J, Y.Y. Nakazawa T, Ooneda G. *Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area*. Jpn J Stroke, 1986. 8: 1-8.

27. Grotta, J.C. et A.V. Alexandrov, *tPA-associated reperfusion after acute stroke demonstrated by SPECT*. Stroke, 1998. 29(2): 429-32.
28. Tamura, A. et al. *Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion*. J Cereb Blood Flow Metab, 1981. 1(1): 53-60.
29. Watson, B.D. et al. *Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis*. Ann Neurol, 1985. 17(5): 497-504.
30. Durukan, A. et T. Tatlisumak, *Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia*. Pharmacol Biochem Behav, 2007. 87(1): 179-97.
31. Aronowski, J. R. Strong, et J.C. Grotta, *Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats*. J Cereb Blood Flow Metab, 1997. 17(10): 1048-56.
32. Doccol Corporation, D. *Doccol MCAO Sutures Reduce SD to 5% of Its Corresponding Mean Value for Infarction Volume*. 2015; Dostupno na: http://www.doccol.com/information.php?info_id=22.
33. Katsura, K. T. Kristian, et B.K. Siesjo, *Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain*. Biochem Soc Trans, 1994. 22(4): 991-6.
34. Smith, W.S. *Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective*. J Vasc Interv Radiol, 2004. 15(1 Pt 2): S3-12.
35. Dereski, M.O. et al. *The heterogeneous temporal evolution of focal ischemic neuronal damage in the rat*. Acta Neuropathol, 1993. 85(3): 327-33.
36. Dirnagl, U. C. Iadecola, et M.A. Moskowitz, *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view*. Trends Neurosci, 1999. 22(9): 391-7.
37. Takano, K. et al. *Glycine site antagonist attenuates infarct size in experimental focal ischemia. Postmortem and diffusion mapping studies*. Stroke, 1997. 28(6): 1255-62; discussion 1263.
38. Dijkhuizen, R.M. et al. *Correlation between tissue depolarizations and damage in focal ischemic rat brain*. Brain Res, 1999. 840(1-2): 194-205.
39. McIlvoy, L.H. *The effect of hypothermia and hyperthermia on acute brain injury*. AACN Clin Issues, 2005. 16(4): 488-500.
40. Fujimura, M. et al. *Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion*. Brain Res, 1999. 842(1): 92-100.
41. De Keyser, J. et al. *Neuroprotection in acute ischemic stroke*. Acta Neurol Belg, 2005. 105(3): 144-8.
42. Ginsberg, M.D. *Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future*. Neuropharmacology, 2008. 55(3): 363-89.
43. Candelario-Jalil, E. *Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics*. Curr Opin Investig Drugs, 2009. 10(7): 644-54.
44. Ames, A. 3rd, et al. *Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon*. Am J Pathol, 1968. 52(2): 437-53.
45. Frank-Cannon, T.C. et al. *Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases?* Mol Neurodegener, 2009. 4: 47.
46. Kettenmann, H. et A. Verkhratsky, *Neuroglia: the 150 years after*. Trends Neurosci, 2008. 31(12): 653-9.
47. Jessen, K.R. et R. Mirsky, *Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein*. Nature, 1980. 286(5774): 736-7.
48. Rasband, M.N. *Glial Contributions to Neural Function and Disease*. Mol Cell Proteomics, 2016. 15(2): 355-61.
49. del Rio-Hortega P, P.W. *Cerebral Cicatrix: the Reaction of Neuroglia and Microglia to Brain Wounds*. Bulletin of the Johns Hopkins Hospital 1892. 41: : 2786303.
50. P, d.R.-H. *Microglia*, in *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*. 1937. 4816 534.
51. Hanisch, U.K. et H. Kettenmann, *Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain*. Nat Neurosci, 2007. 10(11): 1387-94.

52. Perry, V.H. D.A. Hume, et S. Gordon, *Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain*. Neuroscience, 1985. 15(2): 313-26.
53. Ginhoux, F. et al. *Origin and differentiation of microglia*. Front Cell Neurosci, 2013. 7: 45.
54. Lelekov-Boissard, T. et al. *Exploration of beneficial and deleterious effects of inflammation in stroke: dynamics of inflammation cells*. Philos Trans A Math Phys Eng Sci, 2009. 367(1908): 4699-716.
55. del Zoppo, G.J. *Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia*. Neuroscience, 2009. 158(3): 972-82.
56. Denes, A. et al. *Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2007. 27(12): 1941-53.
57. Neumann, J. et al. *Microglia provide neuroprotection after ischemia*. FASEB J, 2006. 20(6): 714-6.
58. Ekdahl, C.T. Z. Kokaia, et O. Lindvall, *Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia*. Neuroscience, 2009. 158(3): 1021-9.
59. Ceulemans, A.G. et al. *The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia*. J Neuroinflammation, 2010. 7: 74.
60. Lai, A.Y. et K.G. Todd, *Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions*. Can J Physiol Pharmacol, 2006. 84(1): 49-59.
61. Weston, R.M. et al. *Inflammatory cell infiltration after endothelin-1-induced cerebral ischemia: histochemical and myeloperoxidase correlation with temporal changes in brain injury*. J Cereb Blood Flow Metab, 2007. 27(1): 100-14.
62. Lalancette-Hebert, M. et al. *Live imaging of Toll-like receptor 2 response in cerebral ischaemia reveals a role of olfactory bulb microglia as modulators of inflammation*. Brain, 2009. 132(Pt 4): 940-54.
63. Tower, D.B. *The role of astroglia as modulators of neuronal function in cerebral cortex: comparative data, and observations in vivo and in vitro in fluid, electrolyte and amino acid interrelationships*. Vopr Biokhim Mozga, 1973. 8: 269-88.
64. Simard, M. et al. *Signaling at the gliovascular interface*. J Neurosci, 2003. 23(27): 9254-62.
65. Nedergaard, M. et U. Dirnagl, *Role of glial cells in cerebral ischemia*. Glia, 2005. 50(4): 281-6.
66. Chen, Y. et R.A. Swanson, *Astrocytes and brain injury*. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. 23(2): 137-49.
67. Hochachka, P.W. *Protons and glucose metabolism in shock*. Adv Shock Res, 1983. 9: 49-65.
68. Anderson, C.M. et R.A. Swanson, *Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions*. Glia, 2000. 32(1): 1-14.
69. Ridet, J.L. et al. *Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function*. Trends Neurosci, 1997. 20(12): 570-7.
70. Eng, L.F. R.S. Ghirnikar, et Y.L. Lee, *Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)*. Neurochem Res, 2000. 25(9-10): 1439-51.
71. Takizawa, S. et al. *Immunohistochemical localization of glutathione peroxidase in infarcted human brain*. J Neurol Sci, 1994. 122(1): 66-73.
72. Hewett, S.J. C.A. Csernansky, et D.W. Choi, *Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS*. Neuron, 1994. 13(2): 487-94.
73. Feuerstein, G.Z. X. Wang, et F.C. Barone, *The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma*. Neuroimmunomodulation, 1998. 5(3-4): 143-59.
74. Dong, Y. et E.N. Benveniste, *Immune function of astrocytes*. Glia, 2001. 36(2): 180-90.
75. Pekny, M. et M. Nilsson, *Astrocyte activation and reactive gliosis*. Glia, 2005. 50(4): 427-34.
76. Bush, T.G. et al. *Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice*. Neuron, 1999. 23(2): 297-308.
77. Silver, J. et J.H. Miller, *Regeneration beyond the glial scar*. Nat Rev Neurosci, 2004. 5(2): 146-56.
78. Konsman, J.P. B. Drukarch, and A.M. Van Dam, *(Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology*. Clin Sci (Lond), 2007. 112(1): 1-25.

79. Felger, J.C. et al. *Brain dendritic cells in ischemic stroke: time course, activation state, and origin*. Brain Behav Immun, 2010. 24(5): 724-37.
80. Borregaard, N. *Neutrophils, from marrow to microbes*. Immunity, 2010. 33(5): 657-70.
81. Kriz, J. *Inflammation in ischemic brain injury: timing is important*. Crit Rev Neurobiol, 2006. 18(1-2): 145-57.
82. Yilmaz, G. et D.N. Granger, *Cell adhesion molecules and ischemic stroke*. Neurol Res, 2008. 30(8): 783-93.
83. Iadecola, C. et J. Anrather, *The immunology of stroke: from mechanisms to translation*. Nat Med, 2011. 17(7): 796-808.
84. Shichita, T. et al. *Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke*. J Neurochem, 2012. 123 Suppl 2: 29-38.
85. Gelderblom, M. et al. *Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke*. Stroke, 2009. 40(5): 1849-57.
86. Jin, R. G. Yang, et G. Li, *Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells*. J Leukoc Biol, 2010. 87(5): 779-89.
87. Vitkovic, L. S. Maeda, et E. Sternberg, *Anti-inflammatory cytokines: expression and action in the brain*. Neuroimmunomodulation, 2001. 9(6): 295-312.
88. Alberts B, J.A. Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. 2002, New York: Garland Science.
89. Nusslein-Volhard, C. et al. *A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of Drosophila*. Nature, 1980. 283(5746): 474-6.
90. Lemaitre, B. et al. *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996. 86(6): 973-83.
91. Hashimoto, C. K.L. Hudson, et K.V. Anderson, *The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein*. Cell, 1988. 52(2): 269-79.
92. Gay, N.J. et F.J. Keith, *Drosophila Toll and IL-1 receptor*. Nature, 1991. 351(6325): 355-6.
93. Hopkins, P.A. et S. Sriskandan, *Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond*. Clin Exp Immunol, 2005. 140(3): 395-407.
94. Godfroy, J.I. 3rd, et al. *Isolated Toll-like receptor transmembrane domains are capable of oligomerization*. PLoS One, 2012. 7(11): e48875.
95. Sabroe, I. et al. *The role of TLR activation in inflammation*. J Pathol, 2008. 214(2): 126-35.
96. Heil, F. et al. *The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily*. Eur J Immunol, 2003. 33(11): 2987-97.
97. Matsumoto, M. et al. *Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells*. J Immunol, 2003. 171(6): 3154-62.
98. Ahmad-Nejad, P. et al. *Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments*. Eur J Immunol, 2002. 32(7): 1958-68.
99. Underhill, D.M. et al. *The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens*. Nature, 1999. 401(6755): 811-5.
100. Schreibelt, G. et al. *Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2010. 59(10): 1573-82.
101. Nilsen, N. et al. *Lipopolysaccharide and double-stranded RNA up-regulate toll-like receptor 2 independently of myeloid differentiation factor 88*. J Biol Chem, 2004. 279(38): 39727-35.
102. Fan, J. R.S. Frey, et A.B. Malik, *TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase*. J Clin Invest, 2003. 112(8): 1234-43.
103. Olson, J.K. et S.D. Miller, *Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs*. J Immunol, 2004. 173(6): 3916-24.
104. Tang, S.C. et al. *Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(34): 13798-803.
105. Marsh, B.J. R.L. Williams-Karnesky, et M.P. Stenzel-Poore, *Toll-like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke*. Neuroscience, 2009. 158(3): 1007-20.
106. Tsan, M.F. et B. Gao, *Endogenous ligands of Toll-like receptors*. J Leukoc Biol, 2004. 76(3): 514-9.

107. Saitoh, S. et al. *Ligand-dependent Toll-like receptor 4 (TLR4)-oligomerization is directly linked with TLR4-signaling*. J Endotoxin Res, 2004. 10(4): 257-60.
108. Medzhitov, R. *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. 1(2): 135-45.
109. Dabbagh, K. et D.B. Lewis, *Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses*. Curr Opin Infect Dis, 2003. 16(3): 199-204.
110. Takeda, K. et S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. 17(1): 1-14.
111. Kawai, T. et al. *Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes*. J Immunol, 2001. 167(10): 5887-94.
112. Marsh, B.J. *Preconditioning reprograms TLR signaling following cerebral ischemia the emergence of a neuroprotective program*, ed. S. Archive. Vol. Paper 408. 2008, Oregon.
113. Erridge, C. *Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants?* J Leukoc Biol, 2010. 87(6): 989-99.
114. Scheibner, K.A. et al. *Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2*. J Immunol, 2006. 177(2): 1272-81.
115. Funderburg, N. et al. *Human -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(47): 18631-5.
116. Lehnardt, S. et al. *Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia*. J Neuroimmunol, 2007. 190(1-2): 28-33.
117. Ziegler, G. et al. *TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 359(3): 574-9.
118. Aliprantis, A.O. et al. *The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2*. EMBO J, 2000. 19(13): 3325-36.
119. Koedel, U. et al. *Acute brain injury triggers MyD88-dependent, TLR2/4-independent inflammatory responses*. Am J Pathol, 2007. 171(1): 200-13.
120. Bohacek, I. et al. *Toll-like receptor 2 deficiency leads to delayed exacerbation of ischemic injury*. J Neuroinflammation, 2012. 9: 191.
121. Boha ek, I. *Uloga receptora TLR2 u odgovoru mozga nakon ishemiskoga oštećenja*. 2012, Zagreb: Sveu ili-te u Zagrebu.
122. Oliveira-Nascimento, L. P. Massari, et L.M. Wetzler, *The Role of TLR2 in Infection and Immunity*. Front Immunol, 2012. 3: 79.
123. Hayasaka, N. et al. *In vivo diagnostic imaging using micro-CT: sequential and comparative evaluation of rodent models for hepatic/brain ischemia and stroke*. PLoS One, 2012. 7(2): e32342.
124. Heiss, W.D. et al. *Dynamic penumbra demonstrated by sequential multitracer PET after middle cerebral artery occlusion in cats*. J Cereb Blood Flow Metab, 1994. 14(6): 892-902.
125. Seo, Y. et al. *Rodent brain imaging with SPECT/CT*. Med Phys, 2007. 34(4): 1217-20.
126. Thorek, D. et al. *Cerenkov imaging - a new modality for molecular imaging*. Am J Nucl Med Mol Imaging, 2012. 2(2): 163-73.
127. Gravel, M. Y.C. Weng, et J. Kriz, *Model system for live imaging of neuronal responses to injury and repair*. Mol Imaging, 2011. 10(6): 434-45.
128. Li, J. et al. *Cage the firefly luciferin! - a strategy for developing bioluminescent probes*. Chem Soc Rev, 2013. 42(2): 662-76.
129. Harvey, E.N. *A history of luminescence from the earliest times until 1900*, ed. T.A.P. Society. Vol. 44. 1957, Philadelphia.
130. Shimomura, O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*. 2012, Singapore: World Scientific Publishing.
131. Aldrich, S. *VivoGlo - Z-DEVD-Aminoluciferin*. 2015; Dostupno na: <http://www.sigmaldrich.com/catalog/product/sigma/l9504?lang=en®ion=HR>.
132. Contag, C.H. et al. *Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts*. Mol Microbiol, 1995. 18(4): 593-603.
133. Samar Basu, L.W. *Studies on Experimental Models*. 2011, New York: Humana Press.

134. Cordeau, P. Jr. et al. *Live imaging of neuroinflammation reveals sex and estrogen effects on astrocyte response to ischemic injury*. Stroke, 2008. 39(3): 935-42.
135. Maysinger, D. et al. *Real-time imaging of astrocyte response to quantum dots: in vivo screening model system for biocompatibility of nanoparticles*. Nano Lett, 2007. 7(8): 2513-20.
136. Keller, A.F. M. Gravel, et J. Kriz, *Live imaging of amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: disease onset is characterized by marked induction of GFAP in Schwann cells*. Glia, 2009. 57(10): 1130-42.
137. Keller, A.F. M. Gravel, et J. Kriz, *Treatment with minocycline after disease onset alters astrocyte reactivity and increases microgliosis in SOD1 mutant mice*. Exp Neurol, 2011. 228(1): 69-79.
138. Carmichael, S.T. et al. *Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex*. Exp Neurol, 2005. 193(2): 291-311.
139. Aigner, L. et al. *Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice*. Cell, 1995. 83(2): 269-78.
140. Dent, E.W. et K.F. Meiri, *Distribution of phosphorylated GAP-43 (neuromodulin) in growth cones directly reflects growth cone behavior*. J Neurobiol, 1998. 35(3): 287-99.
141. Latchney, S.E. et al. *Developmental and adult GAP-43 deficiency in mice dynamically alters hippocampal neurogenesis and mossy fiber volume*. Dev Neurosci, 2014. 36(1): 44-63.
142. Shen, Y. et al. *Growth-associated protein-43 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system*. J Neurosci, 2002. 22(1): 239-47.
143. De la Monte, S.M. et al. *GAP-43 gene expression during development: persistence in a distinctive set of neurons in the mature central nervous system*. Brain Res Dev Brain Res, 1989. 46(2): 161-8.
144. Stroemer, R.P. T.A. Kent, et C.E. Hulsebosch, *Acute increase in expression of growth associated protein GAP-43 following cortical ischemia in rat*. Neurosci Lett, 1993. 162(1-2): 51-4.
145. Goto, S. et al. *Increased expression of growth-associated protein GAP-43/B-50 following cerebral hemitransection or striatal ischemic injury in the substantia nigra of adult rats*. Brain Res, 1994. 647(2): 333-9.
146. Li, Y. et al. *Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats*. Stroke, 1998. 29(9): 1972-80; discussion 1980-1.
147. Martzen, M.R. et al. *Altered phosphorylation of growth-associated protein B50/GAP-43 in Alzheimer disease with high neurofibrillary tangle density*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(23): 11187-91.
148. Teunissen, C.E. et al. *Growth-associated protein 43 in lesions and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2006. 32(3): 318-31.
149. Parhad, I.M. R. Oishi, et A.W. Clark, *GAP-43 gene expression is increased in anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis*. Ann Neurol, 1992. 31(6): 593-7.
150. Ikemoto, A. A. Hirano, et I. Akiguchi, *Increased expression of growth-associated protein 43 on the surface of the anterior horn cells in amyotrophic lateral sclerosis*. Acta Neuropathol, 1999. 98(4): 367-73.
151. Perrin, F.E. et al. *No widespread induction of cell death genes occurs in pure motoneurons in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model*. Hum Mol Genet, 2005. 14(21): 3309-20.
152. Han, M.H. et al. *The novel caspase-3 substrate Gap43 is involved in AMPA receptor endocytosis and long-term depression*. Mol Cell Proteomics, 2013. 12(12): 3719-31.
153. O'Brien, M.A. et al. *Homogeneous, bioluminescent protease assays: caspase-3 as a model*. J Biomol Screen, 2005. 10(2): 137-48.
154. Canadian Council on Animal Care (CCAC). *Guide to the care and use of experimental animals*. 1993, ©Canadian Council on Animal Care,: Canada.
155. Charles River. *C57Bl/6 Mice*. 2015; Dostupno na: <http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/c57bl-6n-mouse>.
156. Laboratory, T.J. *Tlr2-/- mice*. 2015; Dostupno na: <https://www.jax.org/strain/004650>.

157. Porrero, C. et al. *Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice*. Brain Res, 2010. 1345: 59-72.
158. Laboratory, T.J. *Mouse strain Data Sheet Thy1-YFP*. 2015; Dostupno na: <https://www.jax.org/strain/003709>.
159. Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. 1999, Washington (DC):); 2009. National Academies Press (US).
160. Miyazawa, T. et al. *Effect of mild hypothermia on focal cerebral ischemia. Review of experimental studies*. Neurol Res, 2003. 25(5): 457-64.
161. Rousselet, E. J. Kriz, et N.G. Seidah, *Mouse model of intraluminal MCAO: cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining*. J Vis Exp, 2012(69).
162. Lee, R.M. *Morphology of cerebral arteries*. Pharmacol Ther, 1995. 66(1): 149-73.
163. Garcia, J.H. et al. *Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation*. Stroke, 1995. 26(4): 627-34; discussion 635.
164. Schallert, T. et al. *CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury*. Neuropharmacology, 2000. 39(5): 777-87.
165. Tennant, K.A. et T.A. Jones, *Sensorimotor behavioral effects of endothelin-1 induced small cortical infarcts in C57BL/6 mice*. J Neurosci Methods, 2009. 181(1): 18-26.
166. Starkey, M.L. et al. *Assessing behavioural function following a pyramidotomy lesion of the corticospinal tract in adult mice*. Exp Neurol, 2005. 195(2): 524-39.
167. Lalancette-Hebert, M. et al. *Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain*. J Neurosci, 2007. 27(10): 2596-605.
168. Elmer, P. 2015.
169. Goldlust, E.J. et al. *Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains*. Stroke, 1996. 27(9): 1657-62.
170. Kramer, M. et al. *TTC staining of damaged brain areas after MCA occlusion in the rat does not constrict quantitative gene and protein analyses*. J Neurosci Methods, 2010. 187(1): 84-9.
171. Benedek, A. et al. *Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats*. Brain Res, 2006. 1116(1): 159-65.
172. Engel, O. et al. *Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model*. J Vis Exp, 2011(47).
173. Meisel, C. et al. *Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke*. Stroke, 2004. 35(1): 2-6.
174. Liauw, J. et al. *Thrombospondins 1 and 2 are necessary for synaptic plasticity and functional recovery after stroke*. J Cereb Blood Flow Metab, 2008. 28(10): 1722-32.
175. D'Amelio, M. V. Cavallucci, et F. Cecconi, *Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death*. Cell Death Differ, 2010. 17(7): 1104-14.
176. Aswendt, M. et al. *Boosting bioluminescence neuroimaging: an optimized protocol for brain studies*. PLoS One, 2013. 8(2): e55662.
177. Slee, E.A. C. Adrain, et S.J. Martin, *Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis*. J Biol Chem, 2001. 276(10): 7320-6.
178. Walsh, J.G. et al. *Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(35): 12815-9.
179. International Mouse Phenotyping Consortium. 2015; Dostupno na: <http://www.mousephenotype.org/>.
180. Brea, D. et al. *Toll-like receptors 2 and 4 in ischemic stroke: outcome and therapeutic values*. J Cereb Blood Flow Metab, 2011. 31(6): 1424-31.
181. Lehnardt, S. et al. *TLR2 and caspase-8 are essential for group B Streptococcus-induced apoptosis in microglia*. J Immunol, 2007. 179(9): 6134-43.
182. Lim, J.E. et al. *MyD88 deficiency ameliorates beta-amyloidosis in an animal model of Alzheimer's disease*. Am J Pathol, 2011. 179(3): 1095-103.

183. Lim, J.E. et al. *The effects of MyD88 deficiency on exploratory activity, anxiety, motor coordination, and spatial learning in C57BL/6 and APPswe/PS1dE9 mice*. Behav Brain Res, 2012. 227(1): 36-42.
184. Han, J. *MyD88 beyond Toll*. Nat Immunol, 2006. 7(4): 370-1.
185. Minami, M. *[Neuro-glio-vascular interaction in ischemic brains]*. Yakugaku Zasshi, 2011. 131(4): 539-44.
186. Hill, J.K. et al. *Temporal modulation of cytokine expression following focal cerebral ischemia in mice*. Brain Res, 1999. 820(1-2): 45-54.
187. Clausen, B.H. et al. *A quantitative in situ hybridization and polymerase chain reaction study of microglial-macrophage expression of interleukin-1beta mRNA following permanent middle cerebral artery occlusion in mice*. Neuroscience, 2005. 132(4): 879-92.
188. Babcock, A.A. et al. *Toll-like receptor 2 signaling in response to brain injury: an innate bridge to neuroinflammation*. J Neurosci, 2006. 26(49): 12826-37.
189. McCoy, M.K. et M.G. Tansey, *TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease*. J Neuroinflammation, 2008. 5: 45.
190. Kruidinger, M. et G.I. Evan, *Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"?* IUBMB Life, 2000. 50(2): 85-90.
191. Hulsebosch, C.E. et al. *Traumatic brain injury in rats results in increased expression of Gap-43 that correlates with behavioral recovery*. Neurosci Lett, 1998. 255(2): 83-6.
192. Farooque, M. et al. *Changes of extracellular levels of amino acids after graded compression trauma to the spinal cord: an experimental study in the rat using microdialysis*. J Neurotrauma, 1996. 13(9): 537-48.
193. Miyake, K. et al. *Alterations in hippocampal GAP-43, BDNF, and L1 following sustained cerebral ischemia*. Brain Res, 2002. 935(1-2): 24-31.
194. Wietrzycz, M. et al. *Working memory deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice*. Learn Mem, 2005. 12(3): 318-26.
195. Festing, M.F. et D.K. Blackmore, *Life span of specified-pathogen-free (MRC category 4) mice and rats*. Lab Anim, 1971. 5(2): 179-92.
196. Lu, X.C. et al. *Microarray analysis of acute and delayed gene expression profile in rats after focal ischemic brain injury and reperfusion*. J Neurosci Res, 2004. 77(6): 843-57.
197. Satoh, J. et al. *Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis*. Neurobiol Dis, 2005. 18(3): 537-50.
198. Jaluria, P. et al. *A perspective on microarrays: current applications, pitfalls, and potential uses*. Microb Cell Fact, 2007. 6: 4.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1984. godine u Zagrebu. 2008. sam diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a 2009. obavila jednogodišnji pripravni klinički staz doktora u Klinici bolnici Dubrava u Zagrebu te 2011. polofilia stručni ispit.

Od 2009. sam zaposlena na Zavodu za histologiju i embriologiju kao stručni suradnik na projektu prof. dr. sc. Srećka Gajovića „Regeneracija i plastičnost nakon ishemiskog otevrenja mozga proučavane na inovativnim transgennim modelima“, u sklopu kojeg sam u 3 navrata boravila u laboratoriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Laval, Quebec City, Kanada, pod vodstvom prof. dr.sc. Jasne Krifl. 2010. sam izabrana u zvanje asistenta na Katedri za histologiju i embriologiju, a od 2013. sam suradnica na projektu EUFP7 GlowBrain prof.dr.sc. Srećka Gajovića.

Autorica sam 4 CC indeksirana znanstvena rada te 9 safletaka na međunarodnim kongresima. Dodijeljena mi je nagrada za najbolje predstavljanje rada „Uloga gena koji reguliraju kortikogenezu tijekom popravka i regeneracije mozga nakon ishemije“ na Forumu mladih neuroznanstvenika, Young Neuroscientists Forum Ljubljana '13., što je rezultat rada na bilateralnom projektu MZOS-a i njemačkog DAAD-a. Dobitnica sam i stipendije FENS-a (*Federation of Neuroscience Societies*), 2014. za mlade istraživače.

Posjedujem dozvolu privatnog pilota jednomotornog zrakoplova i skipera jedrilice, te sam kategorizirana sportačica u boksu i triatlonu od strane Hrvatskog olimpijskog odbora.

Popis publikacija:

Originalni znanstveni radovi

- I. Gorup D, Bohack I, Milićević T, Pochet R, Mitrević D, Krifl J, Gajović S. Increased expression and colocalization of GAP43 and CASP3 after brain ischemic lesion in mouse. *Neurosci Lett.* 2015 Jun 15;597:176-82.
- II. Winters L, Winters T, Gorup D, Mitrević D, Curlin M, Krifl J, Gajović S. Expression analysis of genes involved in TLR2-related signaling pathway: Inflammation and apoptosis after ischemic brain injury. *Neuroscience.* 2013 May 15;238:87-96.
- III. Dobrivojević M, Bohack I, Erjavec I, Gorup D, Gajović S. Computed microtomography visualization and quantification of mouse ischemic brain lesion by nonionic radio contrast agents. *Croat Med J.* 2013 Feb;54(1):3-11.
- IV. Bohack I, Cordeau P, Lalancette-Hébert M, Gorup D, Weng YC, Gajovic S, Kriz J. Toll-like receptor 2 deficiency leads to delayed exacerbation of ischemic injury. *J Neuroinflammation.* 2012 Aug 8;9:191-198.

Kongresni safeci

- I. **Gorup D**, Bohaček I, Milićević T, Pochet R, Mitre i D, Krifl J, Gajović S (2015) The role of developmentally active genes in postischemic recovery. 4th Croatian Congress of Neuroscience, Split, Croatia, September 17-19, 2015, 42-43
- II. **Gorup D**, Gajović S, Rosario M (2013) The role of corticogenesis-regulating genes during brain repair and regeneration after ischemia. SNC13 SiNAPSA Neuroscience Conference13, Ljubljana, Slovenia, September 27-29, 2013, 57
- III. **Gorup D**, Gajović S, De Rocha M (2013) Corticogenesis controlling genes in the brain repair and regeneration after ischemic lesion in the mouse. 4th Croatian Congress of Neuroscience, Zagreb, Croatia, September 20-21 2013, 36
- IV. **Gorup D**, Bohaček I, Lalancette-Hebert M, Weng YC, Gajović S, Krifl J (2011) Influence of TLR2 on synaptic plasticity after ischemic lesion in a longitudinal study of mice brain recovery. SNC11 SiNAPSA Neuroscience Conference11 Central European FENS Featured Regional Meeting, Ljubljana, Slovenia, September 22-25, 2011
- V. Bohaček I, **Gorup D**, Lalancette-Hebert M, Weng YC, Gajović S, Krifl J (2009) Immune response and the modulation of post-ischemic neurogenesis. Annual Meeting of Croatian Society for Microscopy, Zagreb, Croatia, December 11, 2010
- VI. **Gorup D**, Bohaček I, Lalancette-Hebert M, Weng YC, Gajović S, Krifl J (2010) Synaptic plasticity after ischemic lesion in a longitudinal study of mice brain recovery. COST B30 - Training School Cellular Neuropathology: in vitro models Kiev, Ukraine, 3-7 June 2010
- VII. Bohaček I, **Gorup D**, Lalancette-Hebert M, Weng YC, Gajović S, Krifl J (2010) The relation between postischemic neurogenesis and TLR2 as a mediator of innate immune response. COST-B30 Stem Cells and Neuroregeneration, Haarlem, the Netherlands, February 5-6, 2010
- VIII. Bohaček I, **Gorup D**, Lalancette-Hebert M, Weng YC, Gajović S, Krifl J (2009) Immune response and the modulation of post-ischemic neurogenesis. 3rd Croatian Congress of Neuroscience, Zadar, Croatia, September 24-26, 2009, 50
- IX. Gajović S, Mitre i M, Bohaček I, Dobrivojević M, **Gorup D**, Kapuralin K, Mavrić S, and Kostović -Kneflević LJ (2009) Signal transducing adaptor molecule (STAM2) is expressed in the mouse during embryo development and in the adult brain. Microscopy Conference in Graz, Austria, August 30 - September 4, 2009
- X. Gajović S, Mitre i M, Bohaček I, Dobrivojević M, **Gorup D**, Kapuralin K, Mavrić S, and Kostović -Kneflević LJ (2009) Signal transducing adaptor molecule (STAM2) is expressed in the mouse during embryo development and in the adult brain. EMBO Young Scientists Forum, Zagreb, Croatia, June 15-17, 2009