

# Obilježja upale posredovane TLR2 receptorom nakon ishemijske lezije mišjeg mozga

---

**Srakočić, Sanja**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2023**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:109244>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-26**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Sanja Srakočić**

**Obilježja upale posredovane TLR2  
receptorom nakon ishemijske lezije  
mišjeg mozga**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2023.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Sanja Srakočić**

**Obilježja upale posredovane TLR2  
receptorom nakon ishemijske lezije  
mišjeg mozga**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2023.**

Ova disertacija je izrađena na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za histologiju i embriologiju, u Laboratoriju za regenerativnu neuroznanost Odsjeka za neurogenetiku, medicinsku genetiku i regenerativnu neuroznanost Hrvatskog instituta za istraživanje mozga te u Nastambi za laboratorijske životinje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga. Istraživanje prikazano u ovoj disertaciji provedeno je u sklopu projekata Hrvatske zaklade za znanost: "Projekt razvoja karijere mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti" te "Multimodalni prikaz molekularnih zbivanja tijekom oporavka mišjeg mozga nakon ishemijskog oštećenja – RepairStroke (IP-06-2016-1892)".

Voditelj rada: prof. dr. sc. Srećko Gajović

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD I SVRHA RADA</b> .....	<b>1</b>
1.1. Moždani udar .....	1
1.2. Ishemijska kaskada .....	3
1.2.1. Energetski deficit i ekscitotoksičnost .....	4
1.2.2. Disfunkcija mitohondrija i oksidativni stres .....	5
1.2.3. Odumiranje stanica .....	7
1.2.4. Oštećenje krvno-moždane barijere .....	8
1.3. Upalni odgovor nakon moždanog udara .....	9
1.3.1. Mikroglija .....	10
1.3.2. Perivaskularni makrofagi .....	12
1.3.3. Astrociti .....	13
1.3.4. Oligodendrociti .....	14
1.3.5. Mastociti .....	15
1.3.6. Infiltrirajuće imunosne stanice iz krvi .....	15
1.3.7. Citokini .....	16
1.4. Receptori nalik na Toll .....	19
1.4.1. Podjela i izražaj receptora TLR .....	19
1.4.2. Struktura receptora TLR .....	20
1.4.3. Signalni putevi receptora TLR .....	21
1.4.4. TLR2 u ishemijskom moždanom udaru .....	23
1.5. Životinjski modeli ishemijskog moždanog udara .....	27
1.5.1. Metode izazivanja ishemije mozga u pretkliničkim istraživanjima .....	28
1.5.2. Metode validacije ishemijske lezije na životinjskim modelima .....	29
1.5.3. Primjena <i>in vivo</i> bioluminiscencije u istraživanju moždanog udara .....	31
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	<b>34</b>
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>35</b>
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>36</b>
4.1. Dizajn istraživanja i broj životinja .....	36
4.2. Pokusne životinje .....	40
4.2.1. Usklađenost s etičkim smjernicama i zakonskim propisima .....	40

4.2.2. Mišje linije.....	40
4.2.3. Genotipizacija mišjih linija .....	43
4.3. Izazivanje ishemijske lezije mišjeg mozga.....	46
4.3.1. Značajke korištenog modela okluzije srednje moždane arterije.....	46
4.3.2. Opis zahvata okluzije srednje moždane arterije .....	46
4.3.3. Postoperativna njega životinja.....	48
4.4. Procjena neurološkog deficita .....	49
4.5. Snimanje mišjeg mozga magnetskom rezonancijom .....	52
4.5.1. Protokol za <i>in vivo</i> snimanje magnetske rezonancije mišjeg mozga.....	52
4.5.2. Volumetrijska analiza MRI snimaka mišjeg mozga.....	53
4.6. Snimanje mišjeg mozga metodom <i>in vivo</i> bioluminiscencije .....	55
4.6.1. Protokol snimanja <i>in vivo</i> bioluminiscencije.....	55
4.6.2. Kvantifikacija intenziteta bioluminiscentnog signala .....	56
4.7. Određivanje upalnih biljega u mišjem mozgu metodom protočne citometrije .....	57
4.7.1. Izolacija mišjeg mozga za potrebe protočne citometrije .....	57
4.7.2. Priprema stanica za protočnu citometriju .....	57
4.7.3. Obilježavanje stanica protutijelima konjugiranim fluorescentnom bojom .....	58
4.7.4. Postavke protočne citometrije i strategija razvrstavanja stanica .....	59
4.8. Histološka analiza mišjeg mozga .....	61
4.8.1. Perfuzija i izolacija mišjeg mozga za potrebe histološke analize.....	61
4.8.2. Postfiksacija i krioprotekcija mišjeg mozga.....	61
4.8.3. Protokol za imunohistokemijsko bojenje prereza mišjeg mozga .....	62
4.8.4. Konfokalna mikroskopija .....	63
4.8.5. Kvantifikacija rezultata imunohistokemije.....	64
4.9. Određivanje koncentracije citokina u krvnoj plazmi.....	65
4.9.1. Vađenje krvi i izolacija krvne plazme .....	65
4.9.2. Protokol za analizu koncentracije citokina pomoću sustava LEGENDplex™ .....	66
4.9.3. Kvantifikacija rezultata sustava LEGENDplex™ .....	67
4.10. Statistička obrada podataka .....	68
<b>5. REZULTATI .....</b>	<b>70</b>
5.1. Validacija izražaja luciferaze u novoj mišjoj liniji Tlr2 <sup>-/-</sup> (Tlr2-luc) .....	71
5.1.1. Mišja linija Tlr2 <sup>-/-</sup> (Tlr2-luc) izražava luciferazu unatoč nedostatku receptora TLR2 .....	71

5.1.2. Luciferaza je izražena isključivo u stanicama mikroglije .....	74
5.1.3. Nedostatak receptora TLR2 nije promijenio bazalni bioluminiscentni signal .....	77
5.2. Nedostatak receptora TLR2 ne utječe na preživljenje nakon ishemijske ozljede mozga .....	80
5.3. Nedostatak receptora TLR2 pospješuje smanjenje upale nakon moždanog udara.....	81
5.3.1. Miševi Tlr2-/(Tlr2-luc) imaju veći postotak smanjenja bioluminiscentnog signala nakon ishemijske ozljede.....	81
5.3.2. Ishemijska ozljeda pojačava bioluminiscenciju na ipsilateralnoj i kontralateralnoj hemisferi .....	84
5.3.3. Validacija povećanja izražaja receptora TLR2 nakon ishemijske ozljede metodom protočne citometrije.....	87
5.4. Nedostatak receptora TLR2 dovodi do razvoja veće ishemijske lezije u akutnoj fazi, ali i do bržeg funkcionalnog oporavka .....	91
5.4.1. Miševi Tlr2-/(Tlr2-luc) imaju veću ishemijsku leziju i izraženiji edem .....	91
5.4.2. Brži funkcionalni oporavak miševa Tlr2-/(Tlr2-luc) nakon ishemijskog oštećenja mozga .....	95
5.4.3. Korelacija volumena ishemijske lezije i neurološkog deficita .....	98
5.4.4. Korelacija upale posredovane receptorom TLR2 s parametrima oštećenja mozga nakon moždanog udara.....	100
5.5. Nedostatak receptora TLR2 dovodi do promjena u aktivaciji imunskih stanica nakon ishemijske lezije mozga .....	106
5.5.1. Nedostatak receptora TLR2 pospješuje smanjenje udjela aktivirane mikroglije nakon moždanog udara.....	106
5.5.2. Smanjeno nakupljanje limfocita nakon moždanog udara kod miševa Tlr2-/(Tlr2-luc).....	109
5.6. Nedostatak receptora TLR2 smanjuje izražaj biljega upale posredovane mikroglijom nakon ishemijskog moždanog udara.....	111
5.6.1. Nedostatak receptora TLR2 dovodi do smanjenog izražaja CD68 nakon ishemije .....	111
5.6.2. Aktivacija CD68 nakon moždanog udara prisutna je u cijelom mozgu.....	113
5.6.3. Ko-ekspresija receptora CD68 i TLR2 na stanicama mikroglije nakon moždanog udara .....	117

5.7. Nedostatak receptora TLR2 povećava koncentracije citokina u krvnoj plazmi nakon ishemijske ozljede mozga .....	121
5.7.1. Postavke protočne citometrije za analizu sustava LEGENDplex™ .....	121
5.7.2. Moždani udar povećava koncentracije citokina u krvnoj plazmi .....	122
<b>6. RASPRAVA.....</b>	<b>127</b>
6.1. Nova transgenična mišja linija pouzdan je model za praćenje upale posredovane TLR2 receptorom <i>in vivo</i> bioluminiscencijom.....	128
6.2. Primjena <i>in vivo</i> bioluminiscencije za longitudinalno praćenje upalnog odgovora nakon moždanog udara .....	131
6.3. Signali koje prenosi TLR2 moduliraju ishemijsko oštećenje kod miševa .....	133
6.4. Multimodalnim pristupom u pretkliničkom istraživanju moždanog udara pokazana je povezanost upale i ishemijskog oštećenja .....	136
6.5. Utjecaj TLR2 na nakupljanje limfocita u mozgu nakon ishemijske ozljede.....	139
6.6. Nedostatak receptora TLR2 smanjuje aktivaciju mikroglije nakon moždanog udara	140
6.7. Povezanost upalnih čimbenika s funkcionalnim oporavkom nakon moždanog udara	143
6.8. Povećanje upalnih biljega u perifernoj krvi nakon moždanog udara .....	144
6.9. Prednosti primjene longitudinalnog pristupa u pretkliničkim istraživanjima .....	147
<b>7. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>148</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>149</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>150</b>
<b>10. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>151</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>165</b>



## Popis kratica

7AAD	7-animo-aktinomicin D
ANOVA	analiza varijanci, engl. <i>analysis of variance</i>
APC	alofikocijanin
ATP	adenozin 3-fosfat
BDNF	neurotrofni faktor podrijetlom iz mozga, engl. <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BLI	snimanje bioluminiscencije, engl. <i>bioluminescent imaging</i>
CASP8	kaspaza 8, engl. <i>caspase 8</i>
CCA	zajednička karotidna arterija, engl. <i>common carotid artery</i>
CCD	nabojem spregnuti sklop, engl. <i>charged-coupled device</i>
CCR2	kemokinski receptor 2, engl. <i>chemokine receptor 2</i> ,
CD	stanični diferencijacijski antigen, engl. <i>cluster of differentiation</i>
CK2	kazein kinaza 2
CNTF	cilijarni neurotrofični faktor, engl. <i>ciliary neurotropic factor</i>
CRP	reaktivni protein C, engl. <i>C reactive protein</i>
CT	kompjuterizirana tomografija, engl. <i>computed tomography</i>
Cy7	Cijanin 7
DAMP	molekularni obrasci povezani s oštećenjem, engl. <i>damage associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbeccov modificirani medij, engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTI	snimanje tenzora difuzije, engl. <i>diffusion tensor imaging</i>
DWI	snimanje kontrastiranjem difuzije, engl. <i>diffusion-weighted imaging</i>
ECA	vanjska karotidna arterija, engl. <i>external carotid artery</i>
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
ELISA	enzimski ovisan imunosorbentni serološki test, engl. <i>enzyme-linked-immunosorbent serologic assay</i>
FCS	serum fetalnog goveda, engl. <i>fetal bovine serum</i>
fMRI	funkcionalni MRI
FSC	direktno raspršenje, engl. <i>forward scatter</i>
GAP43	protein 43 povezan s rastom, engl. <i>growth associated protein 43</i>

GDNF	neurotrofni faktor podrijetlom iz stanica glije, engl. <i>glial cell line-derived neurotropic factor</i>
GFAP	glijalni fibrilarni kiseli protein, engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	zeleni fluorescentni protein, engl. <i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	stimulirajući faktor staničnih linija granulocita i makrofaga, engl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GP130	glikoprotein 130
HBSS	Hanksova balansirana otopina soli, engl. <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HIF	faktor induciran hipoksijom, engl. <i>hypoxia-inducible factor</i>
HMGB-1	skupina proteina visoke mobilnosti, engl. <i>high mobility group box 1</i>
HSP	proteini toplinskog šoka, engl. <i>heat shock proteins</i>
IBA1	ionizirana kalcij-vezajuća adapterska molekula 1, engl. <i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
ICA	unutarnja karotidna arterija, engl. <i>internal carotid artery</i>
IFN	interferon
IL	interleukin
IRAK	kinaza povezana s receptorom za interleukin 1, engl. <i>interleukin-1 receptor associated kinase</i>
IRF3	regulatorni faktor interferona, engl. <i>IFN regulatory factor 3</i>
I $\kappa$ BK $\beta$	inhibitor $\beta$ kinaze $\kappa$ B, engl. <i>inhibitor of <math>\kappa</math>B kinase <math>\beta</math></i>
JAK/STAT3	prenositelj signala Janus kinaze i aktivator transkripcije 3, engl. <i>Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3</i>
LUC	luciferaza
MAP2	protein povezan s mikrotubulima, engl. <i>microtubule-associated protein 2</i>
MAPK	protein kinaza aktivirana mitogenom, engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCA	srednja moždana arterija, engl. <i>middle cerebral artery</i>
MCP-1	monocitni kemoatraktantni protein 1, engl. <i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
MFI	medijan fluorescentnog intenziteta, engl. <i>median fluorescent intensity</i>
MHC-II	glavni kompleks gena tkivne podudarnosti, engl. <i>major histocompatibility complex II</i>
MMP	metaloproteinaze matriksa
MPTP	mitohondrijski kanal prolazne propusnosti, engl. <i>mitochondrial permeability transition pore</i>

MRA	MRI angiografija
MRI	snimanje magnetske rezonancije, engl. <i>magnetic resonance imaging</i>
MyD88	mijeloidni faktor diferencijacije, engl. <i>myeloid differentiation factor 88</i>
NeuN	antigen neuronskih jezgara, engl. <i>neuronal nuclear antigen</i>
NF- $\kappa$ B	jezgreni faktor $\kappa$ B, engl. <i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
NGF	faktor rasta živaca, engl. <i>nerve growth factor</i>
NK	stanice prirodni ubojice, engl. <i>natural killer</i>
NMDA	N-metil-D-aspartatna kiselina, engl. <i>N-methyl-D-aspartic acid</i>
NOS	sintaza dušikovog oksida, engl. <i>nitric oxide synthase</i>
Nrf2	jezgreni faktor povezan s faktorom E2, engl. <i>nuclear factor E2-related factor 2</i>
P2Y1	purinogeni receptor 1
PAMP	molekularni obrasci povezani s patogenima, engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	fosfatni pufer, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PE	fikoeritrin
PET	pozitronska emisijska tomografija, engl. <i>positron emission tomography</i>
PFA	paraformaldehid
PI3K	fosfatilinozitol-3 kinaza, engl. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
pMCAO	trajna okluzija srednje moždane arterije, engl. <i>permanent middle cerebral artery occlusion</i>
PPAR	receptor aktiviran proliferacijom peroksisoma, engl. <i>peroxisome proliferator activated receptor</i>
PWI	snimanje efekta perfuzije, engl. <i>perfusion-weighted imaging</i>
qRT-PCR	kvantitativna lančana reakcija polimeraze s korakom reverzne transkripcije, engl. <i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>
rtPA	rekombinantni aktivator tkivnog plazminogena, engl. <i>recombinant tissue plasminogen activator</i>
SDS	natrijev dodecil sulfat
smTLR4	topiva glasnička RNA receptora TLR4, engl. <i>soluble mRNA of TLR4</i>
snRNA	kratka nekodirajuća RNA, engl. <i>small non-coding RNA</i>
SPECT	komputerizirana tomografija posredovana emisijom jednog fotona, engl. <i>single-photon emission computerized tomography</i>

SPIO	male čestice supermagnetskih oksida željeza, engl. <i>small superparamagnetic iron oxides</i>
SSC	postranično raspršenje, engl. <i>side scatter</i>
sTLR	topivi receptori TLR, engl. <i>soluble TLR</i>
TBK1/IKKi	kompleks kinaze koja veže TANK i kinaze inhibitora $\kappa$ B, engl. <i>TANK-binding kinase 1/I<math>\kappa</math>B kinase</i>
TGF- $\beta$	transformirajući faktor rasta $\beta$ , engl. <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TIR	Toll receptor interleukina 1, engl. <i>Toll IL-1 receptor</i>
TLR	receptori nalik Toll-u, engl. <i>Toll-like receptors</i>
Tlr2 <sup>-/-</sup> (Tlr2-luc)	miševi s onemogućenim receptorom TLR2 i istovremenim izražajem luciferaze pod kontrolom promotora gena <i>Tlr2</i> , mišja linija C57BL/6-Tyr <sup>c</sup> -Brd-Tg(Tlr2-luc/gfp) <sup>Kri/Gaj</sup> -Tlr2 <sup>tm1-Kir/Gaj</sup>
tMCAO	prolazna okluzija srednje moždane arterije, engl. <i>transient middle cerebral artery occlusion</i>
TMEM119	transmembranski protein 119, engl. <i>transmembrane protein 119</i>
TNF- $\alpha$	faktor nekroze tumora $\alpha$ , engl. <i>tumour necrosis factor <math>\alpha</math></i>
TOLLIP	protein koji veže toll, engl. <i>toll interacting protein</i>
TRAF3	faktor povezan s faktorom nekroze tumora, engl. <i>tumour necrosis factor receptor associated factor 3</i>
TRAM	adaptorska molekula povezna s TRIF, engl. <i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TREM2	inducirajući receptor izražen na stanicama mijeloidne linije, engl. <i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
TRIF	adapter s TIR domenom koji inducira interferon $\beta$ , engl. <i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
TTC	2,3,5-trifeniltetrazolij hidroklorid
VEGF	faktor rasta vaskularnog endotela, engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>
VIF	faktor umanjivanja varijance, engl. <i>variance inflation factor</i>
Wt(Tlr2-luc)	miševi divljeg tipa s izražajem luciferaze pod kontrolom promotora gena <i>Tlr2</i> , mišja linija C57BL/6-Tyr <sup>c</sup> -Brd-Tg(Tlr2-luc/gfp) <sup>Kri/Gaj</sup>

# 1. UVOD I SVRHA RADA

## 1.1. Moždani udar

Moždani udar akutni je poremećaj cirkulacije krvi u mozgu koji rezultira naglim gubitkom neuroloških funkcija u trajanju duljem od 24 sata ili koji unutar 24 sata dovede do smrti. Prema uzroku nastanka dijeli se na ishemijski i hemoragijski, od kojih je ishemijski moždani udar učestaliji (1, 2). Treba spomenuti i prolaznu ishemijsku ataku koja se od ishemijskog moždanog udara razlikuje po tome što je gubitak neuroloških funkcija kraći od 24 sata te na radiološkim snimkama mozga nije vidljiva lezija. Ishemijski moždani udar godišnje pretrpi 9.6 milijuna ljudi, a procjenjuje se da će apsolutni broj incidencije rasti s obzirom na povećanje starosti populacije (3). Moždani udar jedan je od vodećih uzroka smrti i invalidnosti u svijetu, a dugotrajne terapije i troškovi liječenja nakon moždanog udara predstavljaju veliko ekonomsko opterećenje (4).

Tipični simptomi moždanog udara uključuju naglu unilateralnu slabost i utruće mišića, unilateralni gubitak vida, smetnje u govoru i glavobolju. Ostali simptomi koji se uglavnom ne povežu odmah s moždanim udarom su mučnina, povraćanje, vrtoglavica i promjene stanja svijesti (1, 2). Dijagnostika se sastoji od pregleda koji se fokusira na procjenu neurološkog deficita, a za potvrdu su neophodne radiološke pretrage CT (kompjuterizirana tomografija, engl. *computed tomography*) i difuzijski MRI (snimanje magnetske rezonancije, engl. *magnetic resonance imaging*) ili MRI angiografija (1). Glavni čimbenici rizika za nastanak moždanog udara su hipertenzija, hiperkolesterolemija, stenoza karotidnih arterija i atrijska fibrilacija. Klinička istraživanja pokazala su da liječenje ovih poremećaja dovodi do smanjenja incidencije moždanog udara (5, 6). Ostali čimbenici rizika uključuju pušenje, prekomjernu konzumaciju alkohola i *diabetes mellitus*. Također, incidencija se može smanjiti promjenom životnih navika i okolišnih čimbenika. U ovu kategoriju pripadaju zagađenje zraka, sveukupno zdravlje i razina tjelesne aktivnosti u djetinjstvu, loše prehrambene navike, tjelesna neaktivnost, prekomjerna tjelesna težina, poremećaji spavanja, kronična upala i dugotrajni stres (1). Otkriveno je i nekoliko rijetkih genetskih mutacija koje su povezane s pojavom moždanog udara u ranijoj životnoj dobi, a moždani udar može nastati i kao posljedica traumatske ozljede glave ili vrata (1).

Uzrok ishemijskog moždanog udara je blokada arterijskog protoka krvi ugruškom koji je nastao negdje drugdje u tijelu, najčešće kao posljedica arteriosklerotičnog plaka te fibrilacije atrijske ili

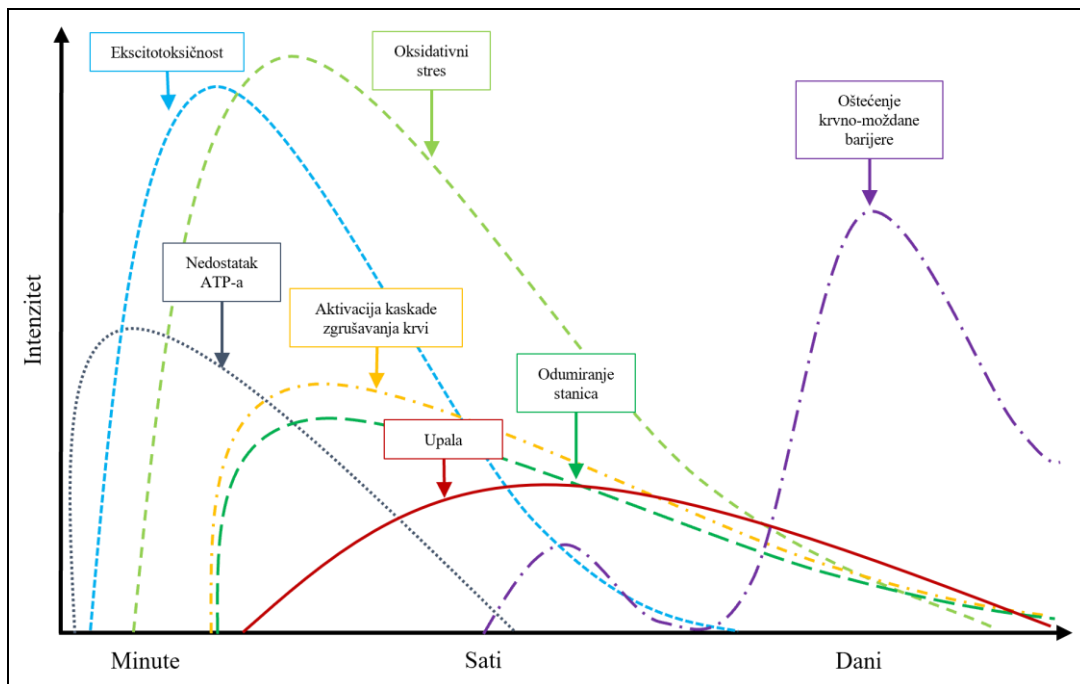
*in situ* trombozom (2). Nakon okluzije arterija u mozgu dolazi do smanjenja protoka krvi što uzrokuje smanjenu aktivnost neurona i pojavu kliničkih simptoma. Ukoliko je protok krvi kritično smanjen dolazi do brzog ireverzibilnog oštećenja tkiva, a mjesto nepovratnog oštećenja se naziva ishemijska jezgra. Mnoge regije mozga se opskrbljuju lepto-meningealnim anastomozama ili kolateralnim ograncima krvnih žila Willisovog kruga, što može pružiti adekvatni protok krvi tijekom okluzije velikih arterija mozga. Ove regije mozga, koje nisu u potpunosti zahvaćene ishemijom te se mogu potencijalno oporaviti, se nazivaju ishemijska penumbra (2). Glavni cilj reperfuzijskih terapija je uspostavljanje normalnog protoka krvi u regiji penumbre kako bi se smanjilo i spriječilo odumiranje stanica. Međutim, reperfuzija može dovesti do sekundarnih oštećenja tkiva koji se klinički očituju kao hemoragijska transformacija ishemijske lezije te pojava edema (2).

Do sada su odobrene samo dvije metode liječenja ishemijskog moždanog udara u akutnoj fazi: tromboliza korištenjem rekombinantnog aktivatora tkivnog plazminogena (rtPA, engl. *recombinant tissue plasminogen activator*) i trombektomija. Nedostatak ovih metoda je što su učinkovite jedino ukoliko se primijene u razdoblju od nekoliko sati nakon pojave simptoma moždanog udara. Terapija korištenjem rtPA se mora primijeniti najkasnije 4.5 h nakon pojave simptoma kako bi bila učinkovita, međutim istovremeno se povećava rizik od pojave intracerebralnog krvarenja (1). Endovaskularna trombektomija ima nešto dulji vremenski prozor primjene, u razdoblju do 6 h nakon pojave simptoma. Uz navedene intervencije, boravak pacijenata na specijaliziranim odjelima za liječenje moždanog udara, zajedno s kontroliranjem prehrane, sprječavanjem dehidracije te prevencijom pojave novog moždanog udara, smanjuje smrtnost i neurološke deficite (1). U posljednjih nekoliko godina se intenzivno poboljšalo osvještavanje ljudi o čimbenicima rizika te su razvijene nove metode prevencije sekundarnog moždanog udara. Otkriveno je i testirano nekoliko lijekova koji imaju potencijalni neuroprotektivni učinak, međutim njihova efikasnost nije potvrđena kliničkim istraživanjima (2).

Zbog navedenih ograničenja terapijskih pristupa i s obzirom da je moždani udar vodeći zdravstveni problem na globalnoj razini, istraživanja patofizioloških mehanizama nakon moždanog udara jedan su od glavnih prioriteta bazičnih i primijenjenih istraživanja u neuroznanosti. Glavna prepreka razvoju novih terapijskih pristupa za liječenje moždanog udara je velika kompleksnost i isprepletenost procesa oštećenja i oporavka mozga nakon moždanog udara.

## 1.2. Ishemijska kaskada

Složeni niz patofizioloških zbivanja koja se odvijaju tijekom i nakon ishemijske ozljede mozga se naziva ishemijska kaskada. Sastoji se od mnogostrukih signalnih puteva čija se aktivacija vremenski preklapa, a intenzitet aktivnosti signalnih puteva ovisi o veličini područja zahvaćenog ishemijom, o trajanju ishemije te o vremenu proteklom nakon reperfuzije. Ovi signalni putevi imaju dvojaku ulogu, mogu biti neuroprotektivni ili dovesti do propadanja oštećenog tkiva (7). Patofiziološki procesi ishemijske kaskade aktiviraju se čim dođe do okluzije, a neki su aktivni i mjesecima nakon uspostavljanja reperfuzije. Ishemijska kaskada se sastoji od energetskeg deficita uzrokovanog nedostatkom ATP-a (adenozin 3-fosfat), ekscitotoksičnosti, oksidativnog stresa, oštećenja krvno-moždane barijere, upale, aktivacije kaskade zgrušavanja krvi i odumiranja stanica (7). Nakon nastupanja okluzije najprije, unutar nekoliko minuta, dolazi do nedostatka energije potrebne za stanični metabolizam. Kao posljedica javljaju se ekscitotoksičnost, peri-infarktne depolarizacije i oksidativni stres koji doprinose dodatnom oštećenju tkiva. Ovi procesi dosežu najveći intenzitet unutar nekoliko sati nakon ishemije. Posljedično, unutar nekoliko sati nakon ishemije započinju procesi upale, odumiranja stanica i aktivacije kaskade zgrušavanja krvi koji traju danima nakon reperfuzije (**Slika 1**). Oštećenje krvno moždane barijere nastaje već nekoliko sati nakon ishemije, međutim intenzitet tog inicijalnog oštećenja nije toliko jaki. Puno veće oštećenje krvno-moždane barijere vidljivo je nekoliko dana nakon okluzije, a nastaje kao posljedica procesa upale, oksidativnog stresa i odumiranja stanica (8).



**Slika 1:** Prikaz mehanizama ishemijske kaskade s naznačenim intenzitetom procesa u ovisnosti o vremenu nakon pojave ishemijske kaskade. Nedostatak ATP-a unutar nekoliko minuta dovodi do ekscitotoksičnosti i pojave oksidativnog stresa u tkivu. Posljedično se pokreću procesi upale i odumiranja stanica. Oštećenje krvno-moždane barijere javlja se u dva navrata: nekoliko sati nakon ishemijske kaskade i intenzivnije oštećenje nekoliko dana nakon ishemijske kaskade. Preuzeto i prilagođeno prema (9).

### 1.2.1. Energetski deficit i ekscitotoksičnost

Središnji živčani sustav ima visoku stopu potrošnje kisika i glukoze te energiju dobiva gotovo isključivo putem procesa oksidativne fosforilacije za koji je neophodna dostupnost kisika. Hipoperfuzija ograničava dovod esencijalnih nutrijenata te stanice ne mogu više proizvoditi adekvatnu količinu ATP-a. Nedostatak energije unutar nekoliko minuta dovodi do disfunkcije ionskih transportera i depolarizacije neurona i glija stanica (10). Posljedično dolazi do otvaranja presinaptičkih ionskih kanala za  $Ca^{2+}$  te do otpuštanja pobudnih neurotransmitera u međustanični prostor. Istovremeno se inducira otpuštanje glutamata iz depolariziranih astrocita koji, zajedno s inhibicijom sinaptičke resorpcije radi nedostatka energije, dovodi do akumulacije glutamata u međustaničnom prostoru. S obzirom na nedostatak kisika stanice dobivaju energiju putem glikolize i anaerobnog disanja, čime dolazi do nakupljanja laktata. Smatra se da je laktat mogući krivac za sekundarno oštećenja nakon moždanog udara te je njegovo nakupljanje povezano s nastankom veće ishemijske lezije i lošijim neurološkim



ishodom (11). Opisani procesi nazivaju se ekscitotoksičnost te zajedno uvelike doprinose oštećenju nakon ishemijske lezije. Nakupljanje glutamata dovodi do prekomjerne stimulacije NMDA (N-metil-D-aspartatna kiselina, engl. *N-methyl-D-aspartic acid*) receptora na ostalim neuronima, koji nisu bili primarno zahvaćeni ishemijom, te posljedično do ulaska iona  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  i  $\text{Ca}^{2+}$  unutar stanice kroz otvorene ionske kanale. Time neuroni postanu depolarizirani, dolazi do ulaska  $\text{Ca}^{2+}$  iona i do otpuštanja glutamata u međustanični prostor čime se lokalno amplificira i širi inicijalni ishemijski inzult (9). Također, voda pasivo slijedi ulazak iona unutar stanice uzrokujući citotoksični edem. Nadalje, s obzirom da je  $\text{Ca}^{2+}$  unutarstanični glasnik, nakon povećanja količine  $\text{Ca}^{2+}$  unutar stanice dolazi do stimulacije raznih signalnih puteva koji rezultiraju staničnom smrću, oksidativnim stresom, disfunkcijom mitohondrija, upalnim procesima te otpuštanjem proteaza za razgradnju izvanstaničnog matriksa. Također dolazi i do aktivacije PI3K-Akt (fosfatilinozitol-3 kinaza, engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*) i BDNF (neurotrofni faktor podrijetlom iz mozga, engl. *brain-derived neurotrophic factor*) signalnih puteva koji potiču preživljavanje stanica te imaju neuroprotektivnu ulogu nakon ishemijske ozljede (7).

### 1.2.2. Disfunkcija mitohondrija i oksidativni stres

Mitohondriji su organele zadužene za održavanje energetske homeostaze unutar stanica. Prilikom nedostatka kisika i glukoze tijekom ishemije dolazi do disfunkcije mitohondrija. Povećana količina iona  $\text{Ca}^{2+}$  u citoplazmi dovodi do otvaranja kanala MPTP (mitohondrijski kanal prolazne propusnosti, engl. *mitochondrial permeability transition pore*) na membrani mitohondrija te do otpuštanja citokroma c u citoplazmu. Istovremeno, nedostatak ATP-a dovodi do depolarizacije membrane mitohondrija te do ulaska iona  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  u mitohondrije (7). Oštećenje mitohondrija aktivira signalne putove mitofagije, a s obzirom da su mitohondriji glavni izvor slobodnih radikala, mitofagijom se smanjuje razina oksidativnog stresa u stanicama (7).

Disfunkcija mitohondrija tijekom ishemije dovodi do oksidativnog stresa i do otpuštanja reaktivnih kisikovih i dušikovih radikala što rezultira aktivacijom upale, stanične smrti i neurotoksičnošću. Tijekom ishemije dolazi do proizvodnje superoksidnog radikala ( $\text{O}_2^-$ ) pomoću enzima ksantin oksidaze, te do njegovog izlaska iz mitohondrija u citoplazmu putem ionskih kanala na membrani mitohondrija čime se aktivira apoptoza. Iz superoksidnog radikala nastaje vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) koji prelazi u hidroksilni radikal ( $\text{OH}^\cdot$ ) (9). Dušikov radikal,

dušikov oksid (NO), nastaje iz L-arginina pomoću tri varijante enzima sintaze dušikovog oksida (NOS, engl. *nitric oxide synthase*). Sintaza dušikovog oksida tipa I konstitutivno je izražena u središnjem živčanom sustavu, a NOS tipa III u endotelnim stanicama. NOS tipa II nije konstitutivno izražena, a njen izražaj se aktivira signalnim putem nakon stimulacije stanica raznim citokinima. Ishemija potiče aktivnost NOS tipa I i III u ranim fazama, dok se razina NOS tipa II povećava nešto kasnije, nakon aktivacije procesa upale. NOS tipa II izražen je u mnogim tipovima stanica, uključujući glija stanice i neutrofile (9). U kontekstu ishemije, NOS tipa I i II imaju toksični učinak, međutim NOS tipa III dovodi do otpuštanja NO u krvnim žilama što rezultira vazodilatacijom i povećanjem protoka krvi u području penumbre. Time se uklanjaju kisikovi radikali te se inhibira adhezija trombocita i leukocita što rezultira neuroprotektivnim učinkom (9).

Reakcijom kisikovih radikala s ostalim molekulama unutar stanice dolazi do stvaranja raznovrsnih radikala. Tijekom ishemije značajnu ulogu ima radikal peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) nastao reakcijom superoksida i dušikovog oksida. Peroksinitrit spontanom raspadanjem otpušta hidroksilni radikal koji uzrokuje najveća oštećenja tkiva. Vodikov peroksid je topljiv u lipidima te može proći kroz staničnu membranu, dok superoksid prolazi kroz anionske kanale, što ovim radikalima omogućuje širenje u okolne stanice. Slobodni radikali utječu na raznovrsne stanične funkcije uključujući inaktivaciju enzima, otpuštanje iona  $\text{Ca}^{2+}$ , denaturaciju proteina, oksidaciju lipida, oštećenje DNA i citoskeleta, razaranje krvno-moždane barijere te kemotaksiju (9). Oštećenjem unutarnje membrane mitohondrija i denaturacijom proteina uključenih u oksidativnu fosforilaciju doprinose disfunkciji mitohondrija (7).

Razina oksidativnog stresa korelira s aktivacijom signalnog puta posredovanog proteinom HIF (faktor induciran hipoksijom, engl. *hypoxia-inducible factor*). Ovaj transkripcijski faktor regulira izražaj enzima glikolize i ostalih proteina koji pomažu stanicama da se prilagode na hipoksiju tijekom ishemije. Uloga ovog signalnog puta u ishemijskoj ozljedi još nije potpuno razjašnjena, međutim postoje naznake za HIF ima neuroprotektivni učinak (12). Nadalje, signalni put posredovan Nrf2 (jezgreni faktor povezan s faktorom E2, engl. *nuclear factor E2-related factor 2*) je ključan za ublažavanje oksidativnog stresa i uspostavljanje normalne funkcije mitohondrija nakon ishemije (7). Signalni put posredovan kazein kinazom 2 (CK2) ima dvojaku ulogu nakon ishemije. Odgovoran je za uklanjanje reaktivnih radikala iz stanice, za smanjenje upalnog odgovora i otpuštanje faktora za rast krvnih žila. Međutim, pokazano je

da istovremeno potiče izražaj enzima čija aktivnost u uvjetima hipoksije rezultira ispuštanjem slobodnih radikala (7).

### 1.2.3. Odumiranje stanica

Nakon ishemijske ozljede mozga većina stanica odumire procesima nekroze i apoptoze, ali uočeni su i ostali oblici stanične smrti. Nekroza je karakterizirana nekontroliranim puknućem stanične membrane i membrane staničnih organela uslijed citotoksičnog edema. Kada stanica umire nekrozom dolazi do izlivanja staničnog sadržaja u međustanični prostor. Oslobođanje glutamata i ostalih toksina prilikom puknuća stanične membrane oštećuje zdrave stanice u okruženju (13). S druge strane, tijekom apoptoze dolazi do postepenog smanjivanja stanice, kondenzacije citoplazme, raspada jezgrine ovojnice te formiranja apoptotičnog tjelešca čime stanica odumire uz minimalno otpuštanje toksičnih tvari u okolno tkivo (13). Iako nekroza i apoptoza predstavljaju oprečne načine odumiranja stanica, oba procesa se simultano odvijaju tijekom i nakon ishemije. Nekroza se uglavnom odvija u ishemijskoj jezgri, dok apoptoza većinom zahvaća stanice penumbre gdje ishemija nije toliko izražena pa postoji dovoljno energije za proizvodnju proteina potrebnih za proces apoptoze (8). Nekoliko čimbenika odlučuje kojim će procesom stanica odumrijeti, kao što su veličina ishemijske jezgre, stupanj zrelosti stanice, koncentracija iona  $Ca^{2+}$  unutar stanice i stanično okruženje (9). Iako se smatralo da je nekroza nekontroliran proces, novija istraživanja pokazuju da su u regulaciju nekroze uključeni mnogi signalni putevi. Usporedno s procesom nekroze dolazi do proizvodnje i sekrecije pro-upalnih citokina čime se pogoršava ishemijska ozljeda (13). Apoptoza se aktivira vanjskim putem preko aktivacije receptora smrti, intrinzičnim putem te signalnim putevima posredovanim proteinima p53 i Notch. Vanjski put se aktivira vezanjem mnogih liganda koji uključuju i pro-upalne citokine. Intrinzični put se aktivira uslijed povećanja koncentracije iona  $Ca^{2+}$  u citoplazmi te ispuštanja citokroma c iz mitohondrija u citoplazmu. Hipoksija, oksidativni stres i oštećenje DNA aktiviraju protein p53 koji posljedično aktivira intrinzični put apoptoze. Signalni put posredovan receptorom Notch ima važnu ulogu u mnogobrojnim procesima središnjeg živčanog sustava, a tijekom ishemije važan je za pokretanje apoptoze u neuronima. Svi putevi aktivacije apoptoze rezultiraju aktivacijom efektorskih kaspaza koje pokreću proces apoptoze (7).

U tkivu zahvaćenom ishemijskom ozljedom dolazi i do aktivacije piroptoze. Tijekom piroptoze nastaje citotoksični edem uz otpuštanje staničnih organela u međustanični prostor, a formiraju se i inflammasomi unutar kojih se nalazi aktivirana kaspaza-1. Najvažnija značajka ovog procesa

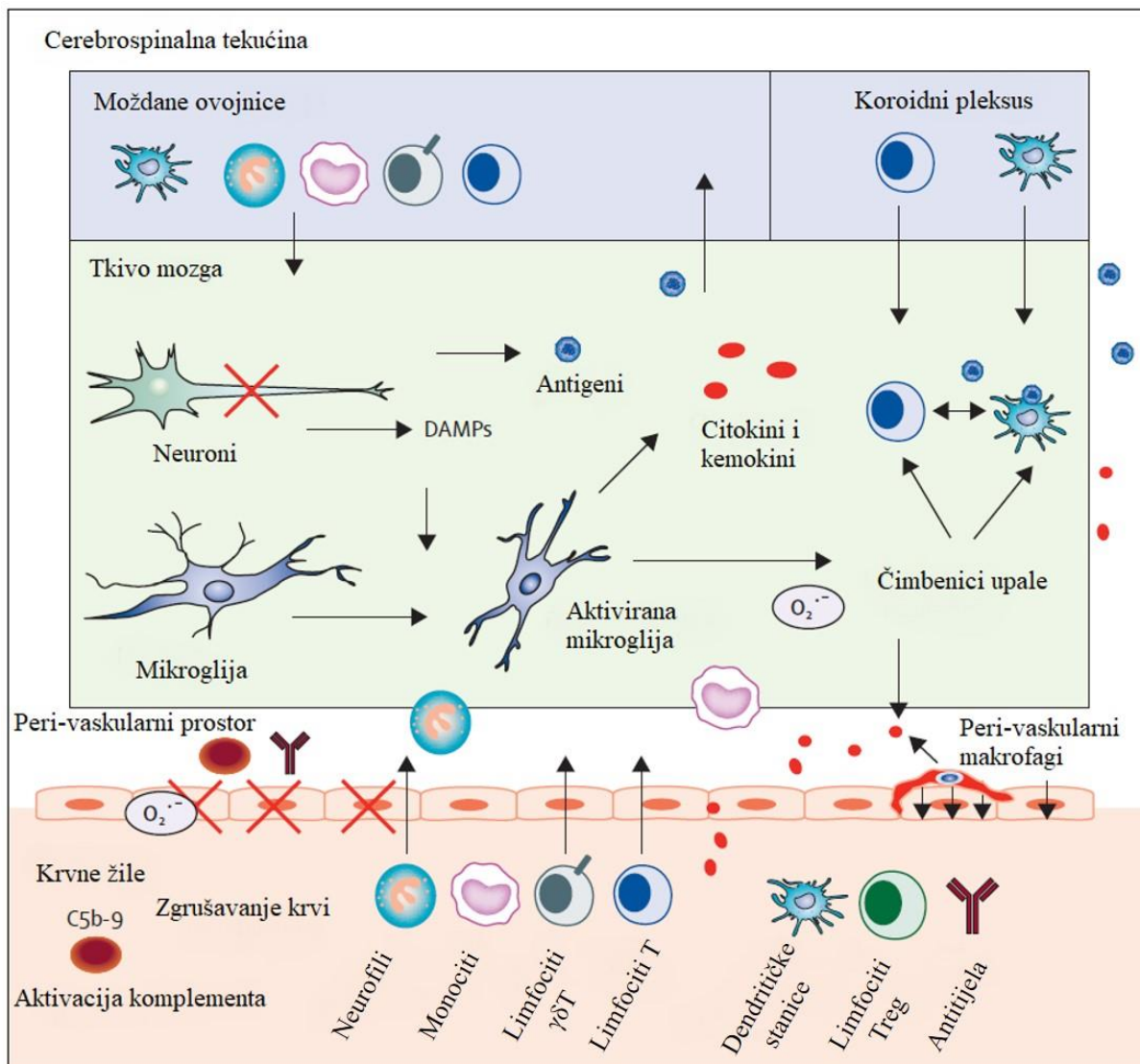
je aktivacija pro-upalnih puteva u tkivu zahvaćenom ishemijom te izlučivanje pro-upalnih citokina IL-1 $\beta$  i IL-18 (IL – interleukin). Piroptoza se najčešće odvija u području penumbre (14). Još jedan važan mehanizam odumiranja stanica je ferroptoza koja je regulirana putem peroksidacije uz prisutnost kationa željeza. Do nakupljanja željeza nakon ishemije dolazi zbog oksidativnog oštećenja stanica te zbog oštećenja krvno-moždane barijere zbog kojeg željezo iz krvi ulazi u neurone. Ferroptoza je uvelike odgovorna za patološke promjene nakon moždanog udara zbog aktivacije kompleksne mreže signalnih puteva koji je reguliraju (15).

#### **1.2.4. Oštećenje krvno-moždane barijere**

Krvno-moždana barijera ograničava pasivnu difuziju molekula, patogena i imunskih stanica iz krvi u parenhim središnjeg živčanog sustava, regulira transport nutrijenata u mozak te sudjeluje u odstranjivanju toksičnih metabolita i ksenobiotika iz mozga. Sastoji se od endotelnih stanica koje su povezane tijesnim spojevima, pericita koji priliježu uz bazalnu membranu endotelnih stanica, mikroglije, astrocita, perivaskularnih makrofaga te od neurona koji ne dolaze u direktni kontakt s endotelnim stanicama (16). Tijekom moždanog udara do oštećenja krvno-moždane barijere dolazi u dva navrata. Unutar nekoliko sati nakon ishemije dolazi do oštećenja bazalne lamine endotelnih stanica čime se povećava propusnost krvno-moždane barijere. Oksidativni stres nakon ishemije aktivira izlučivanje matriks metaloproteinaza (MMP), pogotovo MMP-9, koje razgrađuju proteine izvanstaničnog matriksa te dovode do sekundarnog oštećenja endotelnih stanica. Izvor MMP su neuroni, glija stanice i endotelne stanice (17). Dolazi i do nakupljanja bradikininina, faktora VEGF (faktor rasta vaskularnog endotela, engl. *vascular endothelial growth factor*), trombina i raznih proteaza. Druga faza oštećenja krvno-moždane barijere se odvija 1-3 dana nakon ishemije, a oštećenje je posredovano infiltracijom leukocita koji izlučuju MMP-9 i time doprinose razgradnji izvanstaničnog matriksa (18). Oštećenje krvno-moždane barijere nakon ishemije omogućava nesmetan ulazak komponenti iz krvi u parenhim mozga. Ulazak molekula velike molekularne mase u mozak uvijek je popraćen ulaskom vode procesom osmoze. Kao posljedica dolazi do vazogenog edema koji povećava intrakranijski tlak uzrokujući sekundarna oštećenja tkiva. Ulaskom eritrocita u mjesto ishemijske lezije dolazi do hemoragijske transformacije ishemijske lezije, a oštećena krvno-moždana barijera omogućava ulazak imunskih stanica iz krvi u područje lezije čime se dodatno pogoršava upalni odgovor (9).

### 1.3. Upalni odgovor nakon moždanog udara

Intenzitet upalnog odgovora nakon moždanog udara ovisi o mjestu nastanka i trajanju ishemije te o kompleksnom tijeku razvoja ishemijske ozljede. Upala u središnjem živčanom sustavu nakon ishemijske ozljede se pokreće pomoću oštećenih stanica koje tijekom procesa nekroze i apoptoze otpuštaju molekularne obrasce DAMP (molekularni obrasci povezani s oštećenjem, engl. *damage associated molecular patterns*). Te molekularne obrasce prepoznaju receptori na površini stanica mikroglije i astrociti koji pokreću upalni odgovor. DAMP obuhvaćaju adenzin, proteine toplinskog šoka (HSP, engl. *heat shock proteins*), protein S100, protein HMGB-1 (skupina proteina visoke mobilnosti, engl. *high mobility group box 1*), galektin-3, IL-33, heparan sulfat te fragmente DNA i RNA (19). Vezanjem ovih molekularnih obrazaca na površinske receptore stanica mikroglije pokreće se proces takozvane sterilne upale, koja nije aktivirana patogenima već oštećenjem tkiva. (20). Upalni odgovor u središnjem živčanom sustavu regulira se citokinima i kemokinima, a s obzirom na oštećenje krvno-moždane barijere citokini i kemokini ulaze u krv čime se potiče dolazak perifernih imunskih stanica u područje lezije. Limfociti pojačavaju upalnu reakciju otpuštajući pro-upalne citokine i kemokine, reaktivne radikale te MMP koji dodatno oštećuju krvno-moždanu barijeru. Kao posljedica ovih procesa dolazi do nastanka vazogenog edema te odumiranja neurona. U proces upale nakon moždanog udara su uključene mnogobrojne vrste imunskih stanica, a aktivira se i sustav komplementa (**Slika 2**). Te stanice mogu pogoršati ishod ishemije, ali isto tako mogu imati neuroprotektivan učinak, ovisno o tome u kojem su vremenskom periodu nakon početka ishemije prisutne (19). Stanice upalnog odgovora se dijele na rezidentne stanice središnjeg živčanog sustava: mikroglija, perivaskularni makrofagi, astrociti, oligodendrociti, mastociti; te na infiltrirajuće stanice iz periferne krvi: neutrofilni, monociti, limfociti T i B te dendritičke stanice.



**Slika 2:** Prikaz prostorne raspodjele glavnih medijatora upalnih procesa nakon moždanog udara. Vežanjem molekularnih obrazaca DAMP na receptore mikroglije dolazi do aktivacije upalnog odgovora nakon moždanog udara. Nedostatak kisika i oksidativni stres doprinose aktivaciji komplementa i razaranju krvno-moždane barijere. Stanice mikroglije izlučuju pro-upalne citokine čime privlače imunološke stanice iz periferne krvi: monocite, neutrofile, limfocite i dendritičke stanice. U procesu upale nakon moždanog udara sudjeluju i perivaskularni makrofagi te imunosne stanice u moždanim ovojnicama. Preuzeto i prilagođeno prema (20).

### 1.3.1. Mikroglija

Mikroglija ima sposobnost fagocitoze te su njene glavne uloge uklanjanje patogena, mrtvih stanica, nepotrebnih sinapsi, agregata proteina te ostalih agenasa koji mogu potencijalno

našteti ostalim stanicama središnjeg živčanog sustava. Nadalje, mikroglia izlučuje razne faktore koji reguliraju imunološki odgovor i obnavljanje tkiva. Pripada skupini antigen-prezentirajućih stanica te izražava molekulu MHC-II (glavni kompleks gena tkivne podudarnosti, engl. *major histocompatibility complex II*) (21). Nakon moždanog udara mikroglia stanice prve osjete i reagiraju na ishemiju te pokreću proces upale. Do aktivacije mikroglie dolazi u periodu od 30 min do 1 h nakon ishemije, a imunološki odgovor posredovan mikrogljom perzistira nekoliko tjedana. Tijekom aktivacije mikroglie dolazi do povećanog izražaja površinskih biljega CD11b (CD – stanični diferencijacijski antigen, engl. *cluster of differentiation*) i CD45 te povećanja izražaja proteina udruženog s citoskeletom IBA1 (ionizirana kalcij-vezujuća adapterska molekula 1, engl. *ionized calcium-binding adapter molecule 1*) (22). Nakon aktivacije razlikuju se dva fenotipa mikroglie koji se mogu klasificirati kao pro-upalni M1 i anti-upalni M2. Ovaj proces se još naziva i polarizacija mikroglie, a izmjena fenotipa odvija se ovisno o vremenu proteklom od ishemijske ozljede mozga. Općenito gledajući, u akutnoj fazi moždanog udara aktivan je fenotip M1, odgovoran za pojačavanje upale, dok u kroničnoj fazi prevladava M2 fenotip koji razrješava nastalu upalu i doprinosu oporavku tkiva. Međutim, novija istraživanja pokazuju da se izražaj biljega fenotipa M1/M2 prostorno i dinamički izmjenjuje te da mikroglia može istovremeno izražavati biljege oba fenotipa, ovisno o trenutnoj ulozi koju poprima (23).

Do aktivacije mikroglie nakon moždanog udara dolazi vezanjem molekularnih obrazaca DAMP na receptore stanica mikroglie. Glavni receptori na površini stanica mikroglie su receptori iz porodice TLR (receptori nalik Toll-u, engl. *Toll-like receptors*), receptori za citokine i kemokine, purinski receptori, receptori za glutamat i TREM2 (inducirajući receptor izražen na stanicama mijeloidne linije, engl. *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*). Vezanjem liganda na ove receptore pokreću se signalni putevi od kojih su najvažniji oni posredovani kinazom MAPK (protein kinaza aktivirana mitogenom, engl. *mitogen-activated protein kinase*), transkripcijskim faktorom NF- $\kappa$ B (jezgreni faktor  $\kappa$ B, engl. *nuclear factor  $\kappa$ B*) i receptorom PPAR (receptor aktiviran proliferacijom peroksisoma, engl. *peroxisome proliferator activated receptor*). Osim molekularnih promjena dolazi i do promjene morfologije stanice, koja se očituje u hipertrofiji tijela stanice i razvoju ogranaka za pokretanje koji omogućuju migraciju stanice. Stanice mikroglie prelaze iz mirujućeg ili razgranatog u aktivni ameboidni oblik (24). U akutnoj fazi moždanog udara mikroglia izlučuje mnogobrojne pro-upalne citokine uključujući TNF- $\alpha$  (faktor nekroze tumora  $\alpha$ , engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ), IL-1 $\beta$  i IL-6 koji doprinose pojačavanju upalnog odgovora. Nadalje, izlučuje MMP-9 čime se

dodatno razara krvno-moždana barijere. Time se omogućava ulazak leukocita i neutrofila u područje lezije koji zatim otpuštaju dodatne pro-upalne citokine i MMP pa dolazi do aktivacije kaskadne reakcije koja dodatno pogoršava cijeli proces upale (25). U kroničnoj fazi moždanog udara mikroglia ima ulogu u uklanjanju mrtvih stanica, a lučenjem protu-upalnih citokina (IL-4 i IL-10) dovodi do utišavanja upalnih procesa (26). Proces fagocitoze u stanicama mikroglie posredovan je receptorima TREM2, CD36 i CD68. U ishemijskoj jezgri uočen je veći broj neutrofila u odnosu na mikrogliju, dok je u penumbri ovaj odnos bio obrnut, prevladavale su stanice mikroglie. Ovakvi rezultati upućuju da nakon ishemije mikroglia fagocitira neutrofile, isključivo u području penumbre (27). Nakon ishemije mikroglia fagocitira mrtve ili oštećene neurone, međutim uočeno je smanjenje fagocitoze neurona u području penumbre gdje je oštećenje neurona reverzibilno (28). Mikroglia također utječe na proces mijelinizacije nakon moždanog udara. U akutnoj fazi pro-upalni faktori mikroglie oštećuju oligodendrocite i njihove prekursore čime dolazi do demijelinizacije bijele tvari. Međutim, u kroničnoj fazi mikroglia stimulira proliferaciju prekursora oligodendrocita izlučivanjem faktora VEGF-C, a posljedično dolazi do procesa remijelinizacije aksona (24).

### **1.3.2. Perivaskularni makrofagi**

Kao što im ime kaže, perivaskularni makrofagi se nalaze u perivaskularnom prostoru. Iako imaju isto embrionalno podrijetlo kao i mikroglia, odnosno nastaju u žumanjčanoj vreći, perivaskularni makrofagi se tijekom života obnavljaju infiltracijom monocita nastalih u koštanoj srži. Perivaskularni makrofagi imaju ulogu u očuvanju integriteta krvno-moždane barijere, fagocitozi te prezentiranju antigena putem molekula MHC-II, slično kao i stanice mikroglie (29). Nakon ishemijske lezije broj perivaskularnih makrofaga u zahvaćenom tkivu se povećava na dva načina: proliferacijom rezidentnih makrofaga te ulaskom monocita iz krvi i njihovom diferencijacijom u makrofage (30). Istraživanja na ljudskom tkivu zahvaćenom ishemijskom lezijom pokazala su povećanu fagocitičku aktivnost perivaskularnih makrofaga godinama nakon nastupanja moždanog udara. Njihove fagocitičke vakuole sadržavaju veliku količinu mijelina sugerirajući da perivaskularni makrofagi doprinose procesu demijelinizacije aksona nakon moždanog udara (31). Pretklinička istraživanja pokazala su izražaj i sekreciju pro-upalnih faktora nakon ishemije, a perivaskularni makrofagi indirektno su doprinijeli procesu upale razarajući krvno-moždanu barijeru. Životinje kojima su uklonjeni perivaskularni makrofagi pokazuju smanjeno oštećenje krvno-moždane barijere, smanjenu infiltraciju



granulocita i bolji neurološki ishod iako nije došlo do smanjenja volumena ishemijske lezije (32).

### 1.3.3. Astrociti

Astrociti sudjeluju u održavanju homeostaze, razvoju sinapsi, regulaciji protoka krvi u središnjem živčanom sustavu, uspostavljanju i regulaciji propusnosti krvno-moždane barijere te u kontroli metabolizma neurotransmitera. Tijekom patoloških uvjeta dolazi do promjene njihove morfologije i funkcije, a proces aktivacije astrocita naziva se reaktivna astroglioza. Glavna karakteristika reaktivne astroglioze je proliferacija astrocita čime se formira fizička barijera koja odvaja mjesto ozljede od okolnog zdravog tkiva. Nadalje, aktivirani astrociti reguliraju proces upale izlučivanjem citokina i kemokina. Glavni biljezi reaktivne astroglioze su vimentin, GFAP (glijalni fibrilarni kiseli protein, engl. *glial fibrillary acidic protein*) i S100 $\beta$  (33). Nakon moždanog udara astrociti imaju ključnu ulogu u smanjivanju upalnog odgovora te u regeneraciji propusnosti krvno-moždane barijere, a u kroničnoj fazi pomažu u funkcionalnom oporavku (34).

Nakon moždanog udara aktivirana mikroglia je odgovorna za aktivaciju astrocita. Pro-upalni citokini koje izlučuje mikroglia (IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ ) se vežu na receptor GP130 (glikoprotein 130) na površini stanica astrocita. Posljedično dolazi do aktivacije signalnog puta posredovanog kinazom JAK/STAT3 (prenositelj signala Janus kinaze i aktivator transkripcije 3, engl. *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3*) čime započinje proces reaktivne astroglioze (35). Astrociti se mogu aktivirati i vezanjem purina na receptor P2Y1 (purinogeni receptor 1), koji pokreće signalni put posredovan transkripcijskim faktorom NF- $\kappa$ B, te vezanjem obrazaca DAMP na receptore iz porodice TLR čime se također aktiviraju signalni putevi posredovani s JAK/STAT3 i NF- $\kappa$ B (24). Nakon aktivacije astrociti izlučuju pro-upalne citokine IFN- $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ), IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  te slobodne radikale NO, superoksid i peroksinitrit. Unatoč štetnom učinku ovih faktora, proliferacija astrocita i formiranje ožiljka stvara barijeru između oštećenog tkiva i zdravog tkiva nezahvaćenog ishemijskom. Time se oštećeno tkivo izolira i sprječava se širenje upale i ostalih štetnih čimbenika u okolno tkivo gdje mogu oštetiti zdrave neurone (24). Opisana su dva fenotipa aktiviranih astrocita: A1 i A2. Fenotip A1 se aktivira putem pro-upalnih citokina pridonosi odumiranju neurona i oligodendrocita. Fenotip A2 izlučuje neurotrofične faktore te ima neuroprotektivni učinak.

Povećanje izražaja gena karakterističnih za fenotip A2 uočeno je već 3 dana nakon ishemije (36).

Astroцити су богати glutationom i enzimima uključenim u metabolizam glutationa što im omogućava smanjenje toksičnog učinka oksidativnog stresa nakon ishemije. Pokusima na staničnoj kulturi pokazan je protektivni učinak astrocита na neurone prilikom oksidativnog stresa (37). Nakon ishemije astroцити izlučuju povećanu količinu neurotrofnih čimbenika BDNF, NGF (faktor rasta živaca, engl. *nerve growth factor*), GDNF (neurotrofni faktor podrijetlom iz stanica glije, engl. *glial cell line-derived neurotropic factor*) i CNTF (cilijarni neurotrofni faktor, engl. *ciliary neurotropic factor*). Ovi čimbenici doprinose rastu i oporavku aksona te imaju pozitivni učinak na ishod moždanog udara. Također, pokazano je da GDNF doprinosi oporavku krvno-moždane barijere (35). Astroцити су primarni izvor eritropoetina u mozgu te je pokazano povećanje njegove proizvodnje nakon ishemije. Eritropoetin značajno inhibira apoptozu neurona te dovodi do razvoja manje ishemijske lezije (38). Unatoč mnogobrojnim pozitivnim učincima, aktivacija astrocита može imati i negativne posljedice na ishod moždanog udara. Astroцити imaju mnogobrojne transportere za glutamat te mogu apsorbirati mnogo veće količine glutamata u odnosu na ostale stanice središnjeg živčanog sustava. Međutim, u uvjetima energetske deficita ovi transporteri ne mogu funkcionirati. Posljedično dolazi do izlaska glutamata iz stanica astrocита procesom osmoze čime se povećava ekscitotoksičnost u okolnom tkivu (35). Astroцити također proizvode velike količine pro-upalnih citokina IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$  u akutnoj fazi čime se pogoršava upalni odgovor nakon ishemije (35).

#### **1.3.4. Oligodendrociti**

Oligodendrociti formiraju mijelinske ovojnice aksona u središnjem živčanom sustavu. Tijekom ishemije veliki broj oligodendrocита umire unutar 3 h, dok u kroničnoj fazi imaju važnu ulogu u procesu remijelinizacije aksona (24). Citokini koje u akutnoj fazi izlučuju mikroglia i astroцити se vežu na površinske receptore oligodendrocита i pokreću apoptozu, odgađaju proces mijelinizacije i inhibiraju proliferaciju stanica progenitora oligodendrocита. Međutim, pokazano je da neki pro-upalни citokini mogu imati pozitívni učinak na oligodendrocite. Vezanjem IL-4, IL-6, IL-11, IL-17 potiče se diferencijacija progenitora i preživljavanje oligodendrocита (24). Umirući oligodendrociti otpuštaju HMBG1 koji se veže na receptore TLR na stanicama mikroglije i astrocита čime dolazi do dodatnog pojačavanja upalnog odgovora. Uočeno je

povećanje broja progenitora oligodendrocita nakon moždanog udara u području penumbre, međutim njihov broj se smanjio u ishemijskoj jezgri (39).

### **1.3.5. Mastociti**

Mastociti se nalaze u perivaskularnom prostoru te u vanjskoj moždanoj ovojnici *dura mater*. Aktiviraju se u akutnoj fazi moždanog udara te doprinose razaranju krvno-moždane barijere i nastanku vazogenog edema. Nakon aktivacije otpuštaju granule koje sadrže histamin, serotonin, heparin, kimaze, tripaze i katepsin G. Nakon aktivacije započinje *de novo* sinteza ostalih medijatora upale koji uključuju prostaglandine, leukotrine, tromboksane i citokine. Pokazano je da histamin doprinosi oštećenju krvno-moždane barijere te posljedičnom razvoju vazogenog edema nakon moždanog udara. Također, mastociti se aktiviraju prilikom primjene rtPA nakon ishemijskog moždanog udara te je njihova aktivacija povezana s povećanim rizikom od hemoragije uslijed terapije s rtPA (40). Aktivacija mastocita pogoršava proces upale nakon moždanog udara. Pokazano je da medijatori mastocita doprinose infiltraciji upalnih stanica iz periferne krvi, a istovremenim oštećivanjem krvno-moždane barijere olakšavaju njihov ulazak u područje lezije (40).

### **1.3.6. Infiltrirajuće imunosne stanice iz krvi**

Citokini i molekularni obrasci DAMP tijekom rane faze moždanog udara ulaze u cerebrospinalnu tekućinu i u krv kroz oštećenu krvno-moždanu barijeru. Nakon ulaska u krv pokreću imunološku reakciju u primarnim i sekundarnim limfnim organima što rezultira sistemskim upalnim odgovorom. Povećane razine upalnih čimbenika u krvnoj plazmi uočene su već nekoliko sati nakon ishemije, a njihove vrijednosti se uglavnom smanjuju unutar 24h (41). Uslijed izlaganja stresu endotelne stanice proizvode P-selektin koji je odgovoran za vezanje leukocita u području lezije. Pod utjecajem citokina endotelne stanice počnu proizvoditi i druge molekule za vezanje leukocita: E-selektin, međustaničnu adhezijsku molekulu 1 i adhezijsku molekulu vaskularnih stanica (42). Aktivacija kaskade koagulacije krvi također doprinosi upali u perifernoj krvi. Trombin je kemoatraktant za monocite i neutrofile, potiče izražaj adhezijskih molekula na površini endotelnih stanica te aktivira sustav komplementa. Pokazano je i da stanice mikroglije proizvode komponente komplementa (42).

Vrhunac nakupljanja neutrofila u području ishemijske lezije je 2-3 dana nakon ishemije nakon čega njihov broj počne opadati. Neutrofili doprinose upali nakon moždanog udara razaranjem

krvno-moždane barijere pomoću MMP-9, proizvodnjom reaktivnih radikala doprinose oksidativnom stresu stanica, a nakupljanjem u krvnim žilama smanjuju perfuziju (42). Međutim, novijim istraživanjima uočena je N2 polarizacija neutrofila koja ukazuje na njihovu neuroprotektivnu ulogu nakon moždanog udara (43).

U akutnoj fazi moždanog udara monociti iz periferne krvi ulaze u tkivo lezije putem receptora CCR2 (kemokinski receptor 2, engl. *chemokine receptor 2*, drugog naziva MCP-1 – monocitni kemoatraktantni protein 1, engl. *monocyte chemoattractant protein 1*), a njihov broj dosegne vrhunac 3-4 dana nakon ishemije. Uočeni su u području ishemijske jezgre te u području penumbre, a s obzirom da perzistiraju u tkivu dugo vremena nakon ishemije smatra se da imaju ulogu i u oporavku neurona nakon moždanog udara (44). U akutnoj fazi izlučuju pro-upalne čimbenike, dok u kroničnoj fazi dolazi do njihovog reprogramiranja te počinju izlučivati anti-upalne čimbenike. Zajedno s mikroglijom i perivaskularnim makrofagima uklanjaju ostatke mrtvih stanice procesom fagocitoze te potpomažu oporavku neurona. Također, regrutiraju regulatorne limfocite T koji doprinose oporavku tkiva nakon moždanog udara (45).

Limfociti T doprinose razvoju ozljede nakon ishemijskog moždanog udara. Uočen je utjecaj efektorskih limfocita  $\gamma\delta$ T, čija aktivacija nije posredovana kontaktom s antigenima, na razvoj ishemijske lezije. Glavni negativni čimbenik kojeg limfociti  $\gamma\delta$ T izlučuju je IL-17 (46). Stanice NK (stanice prirodni ubojice, engl. *natural killer*) također imaju negativni efekt na ishod ishemije te je pokazan njihov citotoksični efekt na neurone (47). Regulacijski T limfociti imaju dvojaku ulogu u moždanom udaru. U akutnoj fazi doprinose oštećenju uzrokujući vaskularnu disfunkciju i trombozu. Ovaj mehanizam nije ovisan o aktivaciji limfocita T pomoću antigena. U kroničnoj fazi izlučuju neuroprotektivni citokin IL-10, a postoje dokazi da se IL-10 izlučuje isključivo nakon kontakta regulatornih T limfocita s antigenima (48). Limfociti B također pokazuju dvojaku ulogu u procesima upale nakon moždanog udara. Uključeni su u procese kronične upale nakon moždanog udara, a nakupine limfocita B pronađene su u tkivu lezije. Diferenciraju se u plazma-stanice čije prezentiranje staničnih biljega i izlučivanje imunoglobulina ometa funkcionalni oporavak nakon moždanog udara. Također, pokazan je njihov neuroprotektivni učinak lučenjem IL-10 (49).

### **1.3.7. Citokini**

Citokini su glavni agensi u modulaciji aktivnost imunološkog sustava. Imaju važnu ulogu u procesima aktivacije stanica imunološkog sustava te u njihovoj diferencijaciji, proliferaciji i

adheziji (50). U središnjem živčanom sustavu glavni izvori citokina su stanice mikroglije, astrociti i mastociti, a nakon moždanog udara infiltrirajuće stanice iz periferne krvi također proizvode i otpuštaju citokine u tkivo mozga. Nakon ishemije citokini direktno stimuliraju endotelne stanice, neurone, mikrogliju i astrocite te dovode do aktivacije stanica ili do njihove smrti (26).

TNF- $\alpha$  stimulira proces fagocitoze kod makrofaga i proizvodnju ostalih pro-upalnih citokina kao što su IL-1 i IL-6. Ima važnu ulogu u procesu upale nakon ishemijske ozljede, a pokazana je njegova dvojaka uloga na ishod moždanog udara. Nakon moždanog udara povećava se količina TNF- $\alpha$  u mozgu, cerebrospinalnoj tekućini te u krvnoj plazmi već nekoliko sati nakon ishemije (51). Količina TNF- $\alpha$  se povećava prvih nekoliko dana nakon moždanog udara, a pad njegove koncentracije između 3. i 7. dana nakon ishemije povezan je s poboljšanjem kliničke slike pacijenata (52). TNF- $\alpha$  se pokazao kao dobar prediktor dugoročnog ishoda moždanog udara. Visoke koncentracije u krvnoj plazmi i cerebrospinalnoj tekućini u akutnoj fazi su povezane s većom ishemijskom lezijom i gorim neurološkim ishodom 3 mjeseca nakon moždanog udara (53).

IL-1 $\beta$  također ima važnu ulogu u regulaciji upale te stimulira gotovo sve stanice imunološkog sustava. Proizvodnja IL-1 $\beta$  nakon moždanog udara posredovana je aktivacijom receptora TLR i njihovog signalnog puta (54). Glavni izvor IL-1 $\beta$  u mozgu je mikroglija, a ima pro-upalnu ulogu nakon ishemije. IL-1 $\beta$  utječe na endotelne stanice, povećava prihvaćanje leukocita na stjenke krvnih žila i potiče razvoj vazogenog edema nakon moždanog udara (55). Životinje s atenuiranim genom *Il-1 $\beta$*  razvijaju manje ishemijske lezije, a administracija IL-1 $\beta$  prije izazivanja ishemije rezultira nastankom veće ishemijske lezije (56). Osim izražaja IL-1 $\beta$ , važnu ulogu ima njegov agonist receptor za IL-1 $\beta$  (IL-1R), stoga je za pouzdano predviđanje ishoda ishemije važno je odrediti količinu IL-1 $\beta$  i IL-1R (57).

Proizvodnju IL-6 stimuliraju TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , a njegovu sekreciju mogu modulirati i ostale molekule, npr. prostaglandini. IL-6 je također pro-upalni citokin, a istraživanja ukazuju na kompleksnost njegove uloge u moždanom udaru. U akutnoj fazi pogoršava upalni odgovor dok je u kroničnoj povezan s neuroplastičnosti mozga (58). Količina IL-6 u serumu povećava se nekoliko sati nakon ishemije, a razina ostaje povišena i do 3 mjeseca nakon moždanog udara. Volumen ishemijske lezije negativno korelira s koncentracijom IL-6 upućujući na njegovu protektivnu ulogu u moždanom udaru (59).

IFN- $\gamma$  modulira imunološki odgovor pokretanjem izražaja molekula MHC-I i II na limfocitima T i makrofagima čime dolazi do prezentacije antigena. Također, vezanje IFN- $\gamma$  na njegov receptor stimulira signalne putove posredovane kinazom JAK/STAT (60). Glavni izvor IFN- $\gamma$  nakon moždanog udara su limfociti T. IFN- $\gamma$  potiče M1 polarizaciju mikroglije koja u konačnici dovodi do proizvodnje ostalih pro-upalnih citokina i do kaskadnog povećanja upalnog odgovora nakon moždanog udara (61).

Nakon moždanog udara TNF- $\alpha$  i IL- $\beta$  stimuliraju proizvodnju kemokina MCP-1 koji pojačava upalu dovođenjem leukocita u područje lezije te razara krvno-moždanu barijeru. Razina MCP-1 povećava se 6 h nakon moždanog udara u području penumbre, a visoka koncentracija MCP-1 povezana je s razvojem veće ishemijske lezije (62). Nadalje, uočeno je povećanje količine MCP-1 u krvi i cerebro-spinalnoj tekućini nakon moždanog udara. Inaktivacija gena *Mcp-1* dovodi do smanjenja ishemijske lezije i vazogenog edema te do boljeg funkcionalnog oporavka nakon moždanog udara kod miševa (62). MCP-1 je odgovoran i za infiltraciju makrofaga. Međutim, pokazano je da sprječavanje ulaska makrofaga posredovano kemokinom MCP-1 u područje lezije dovodi do smanjenog protu-upalnog odgovora u kroničnoj fazi moždanog udara što rezultira gorim funkcionalnim ishodom (63).

Osim aktivacije pro-upalnih citokina u ishemijskom moždanom udaru važnu ulogu imaju i anti-upalni citokini. IL-10 je uključen u kontrolu upalnog odgovora te može inhibirati prekomjernu sekreciju pro-upalnih citokina nakon moždanog udara. Učinak IL-10 dovodi do razvoja manje ishemijske lezije (64), a inhibicijom gena *Il-10* se razvija veća lezija te dolazi do pogoršanja neurološkog oštećenja (65).

TGF- $\beta$  (transformirajući faktor rasta  $\beta$ , engl. *transforming growth factor  $\beta$* ) inhibira neutrofile, mikrogliju i astrocite čime direktno smanjuje proizvodnju pro-upalnih citokina nakon moždanog udara i dovodi do inhibicije upalnog odgovora. Glavni izvor TGF- $\beta$  su makrofagi fenotipa M2 (66). IL-4 također zaustavlja proces upale nakon moždanog udara putem polarizacije mikroglije i makrofaga u protu-upalni fenotip M2 (67).

## 1.4. Receptori nalik na Toll

Receptori nalik Toll-u (TLR – engl. *Toll-like receptors*) su porodica transmembranskih receptora čija je funkcija prepoznavanje vanjskih podražaja, uključujući molekularne obrasce. Oni su dio urođene imunosti te nakon vezanja liganda pokreću imunosti odgovor. Receptori TLR prepoznaju molekularne obrasce povezane s patogenima (PAMP, engl. *pathogen-associated molecular patterns*) i DAMP te aktiviraju imunološki odgovor pokretanjem dviju kaskada: signalni put ovisan o proteinu MyD88 (mijeloidni faktor diferencijacije, engl. *myeloid differentiation primary response 88*) i signalni put posredovan proteinom TRIF (adapter s TIR domenom koji inducira interferon  $\beta$ , engl. *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* ) (68).

### 1.4.1. Podjela i izražaj receptora TLR

Gen za *Toll* najprije je otkriven u vinskoj mušici, a kasnije su homologni geni pronađeni u raznim vrstama biljaka, kukaca te u kralješnjacima. Do sada je otkriveno 10 različitih receptora TLR kod čovjeka (TLR1-10) te 12 u miševa (TLR1-9, 11-13), a strukturne sličnosti između čovjeka i miša prisutne su kod receptora TLR1-9. Receptor TLR10 nije funkcionalan kod miševa radi insercije retrovirusa, a čovjeku nedostaju receptori TLR11-13. Receptori TLR se klasificiraju u dvije kategorije, ovisno o mjestu izražaja unutar stanice: TLR1, 2, 4, 5, 6 i 10 se nalaze na staničnoj membrani, dok su receptori TLR3, 7, 8, 9, 11, 12 i 13 izraženi na membranama endoplazmatskog retikuluma, endosoma, lizosoma i endolizosoma (69). Receptori izraženi na staničnoj membrani prepoznaju komponente membrana patogena te mogu prepoznati DAMP, dok se na unutarstanične receptore TLR veže genom bakterija i virusa (70). Također, postoje i varijante receptora TLR koji nisu dio stanične membrane ili membrana organela već su otopljeni u međustaničnoj tekućini. Ove varijante receptora TLR su primarnom strukturom identične receptorima u staničnoj membrani, a razlikuju se po post-translacijskim modifikacijama. Otkriveno je nekoliko receptora sTLR (topivi receptori TLR, engl. *soluble TLR*). Receptor sTLR2 nastaje cijepanjem izvanstanične domene membranskog receptora pomoću metaloproteinaza izvanstaničnog matriksa. Ne zna se točno koji mehanizmi sudjeluju u cijepanju, međutim količina sTLR2 povećava se nakon pokretanja procesa upale. Smatra se da ovim mehanizmom dolazi do utišavanja upalnog odgovora posredovanog receptorom TLR2 jer se uklanjaju funkcionalni receptori s površine stanice te sTLR2 veže i zarobljava PAMP/DAMP u izvanstaničnom prostoru. Time se onemogućava prekomjerno vezanje liganda na stanične receptore te posljedična aktivacija signalnog puta koji rezultira pojačavanjem upale

(71). Osim pomoću metaloproteinaza, sTLR2 nastaje i procesom nekroze. Nakon puknuća stanične membrane u izvanstaničnom matriksu ostaju fragmenti membrane u kojima se nalaze receptori TLR2. Ovi receptori također mogu zarobiti PAMP/DAMP bez pokretanja unutarstaničnog signalnog puta. Cijepanje TLR2 pomoću metaloproteinaza se ne odvija kod sojeva kojima je odstranjena juksta-membranska domena proteina što upućuje na njenu važnu ulogu u regulaciji ovog procesa (71). Za receptor TLR4 otkriveno je alternativno cijepanje mRNA kojim nastaje smTLR4 (topiva glasnička RNA receptora TLR4, engl. *soluble mRNA of TLR4*), a nastali protein sTLR4 se izlučuje izvan stanice. Također nije poznato koji mehanizmi dovode do alternativnog cijepanja mRNA, ali povećanje smTLR4 uočeno je nakon stimulacije stanica pomoću lipo-polisaharida. Ovako dobiven proteinski produkt utišava upalni odgovor zarobljavanjem PAMP/DAMP u izvanstaničnom prostoru, a sTLR4 također može nastati procesom nekroze, istim mehanizmom kao i sTLR2 (72).

U središnjem živčanom sustavu receptori TLR su izraženi u stanicama mikroglije, astrocita, oligodendrocita i neurona. Izražaj je potvrđen i na infiltrirajućim imunskim stanicama iz periferne krvi, uključujući monocite/makrofage, neutrofile i limfocite, te na endotelnim stanicama (68). Mikroglija izražava sve receptore TLR, a dokazan je konstitutivni izražaj receptora TLR2. Astrociti izražavaju TLR2, 3 i 9, ali u mnogo manjoj količini u odnosu na mikrogliju (73). Postoje dokazi o slabom izražaju receptora TLR4 na astrocitima, međutim potrebna su dodatna istraživanja kako bi se izražaj potvrdio. U astrocitima izražaj TLR3 i 4 detektiran je isključivo u staničnoj membrani, dok su isti receptori na mikrogliji prisutni u endosomima (73). Oligodendrociti izražavaju samo TLR2 i 3 (73). Zreli neuroni izražavaju receptore TLR3, 4, 7, 8 i 9, a postoje dokazi o ulozi receptora TLR u diferencijaciji i sazrijevanju neurona (74).

#### **1.4.2. Struktura receptora TLR**

Receptori TLR su transmembranski proteini tipa 1. Na N-terminalnom kraju nalazi se domena za prepoznavanje liganda, transmembranski dio sastavljen je od jednog  $\alpha$ -heliksa, a C-terminalni kraj se nalazi u citoplazmatskoj domeni proteina te se na njega vežu unutarstanične signalne molekule (75). N-terminalna ektodomena građena je od 550-800 aminokiselina na koje se vežu glikani tijekom post-translacijskih modifikacija proteina. Ova domena se nalazi u izvanstaničnom prostoru kod receptora na površini stanice ili u lumenu endosoma kod unutarstaničnih receptora TLR. Transmembranska domena se sastoji od 20 hidrofobnih



aminokiselina. Kod unutarstaničnih receptora TLR ova domena veže proteine koji su specifični za membranu endosoma čime se omogućava ispravno pozicioniranje tih receptora. Kod TLR receptora na površini stanice transmembranska domena ne veže proteine stanične membrane. Citoplazmatska domena receptora TLR se još naziva domena TIR (Toll receptor interleukina 1, engl. *Toll IL-1 receptor*) s obzirom na homologiju sa signalnom domenom receptora za IL-1. Domena TIR pronađena je i na mnogim unutarstaničnim signalnim proteinima koji vezanjem na receptore TLR aktiviraju unutarstanične signalne putove (75). Glavna strukturna karakteristika ektodomene su tandemska ponavljanja bogata leucinom. Ova ponavljanja sadrže hidrofobni bočni ogranak leucina raspoređen u pravilnim intervalima. Tijekom slaganja trodimenzionalne strukture proteina ponavljanja bogata leucinom se zbog hidrofobnih interakcija poslože unutar proteina tvoreći čvrstu jezgru, a izvana se nalaze  $\beta$ -ploče. Ova ponavljanja su također odgovorna za karakteristični oblik ektodomene receptora TLR u obliku potkove. Ligandi se u većini slučajeva vežu za konkavni dio vanjske domene (76).

Nakon vezanja liganda i dimerizacije ektodomene, dolazi do dimerizacije citoplazmatskih domena TIR. Dimerizaciju prepoznaju proteini adapteri, koji također imaju domenu TIR, te pokreću unutarstanični signalni put. Opisane su kristalne strukture monomera i dimera domene TIR. Sastoje se od naizmjeničnih  $\beta$ -ploča i  $\alpha$ -heliksa koji su raspoređeni u strukture 5 paralelnih  $\beta$ -ploča okruženih s 5  $\alpha$ -heliksa. Za formiranje dimera najvažnije su strukture  $\beta$ -petlje koje međusobno povezuju  $\beta$ -ploče. Osim u procesu dimerizacije domene TIR,  $\beta$ -petlje sudjeluju u vezanju proteina adaptera prilikom aktivacije signalnog puta (77).

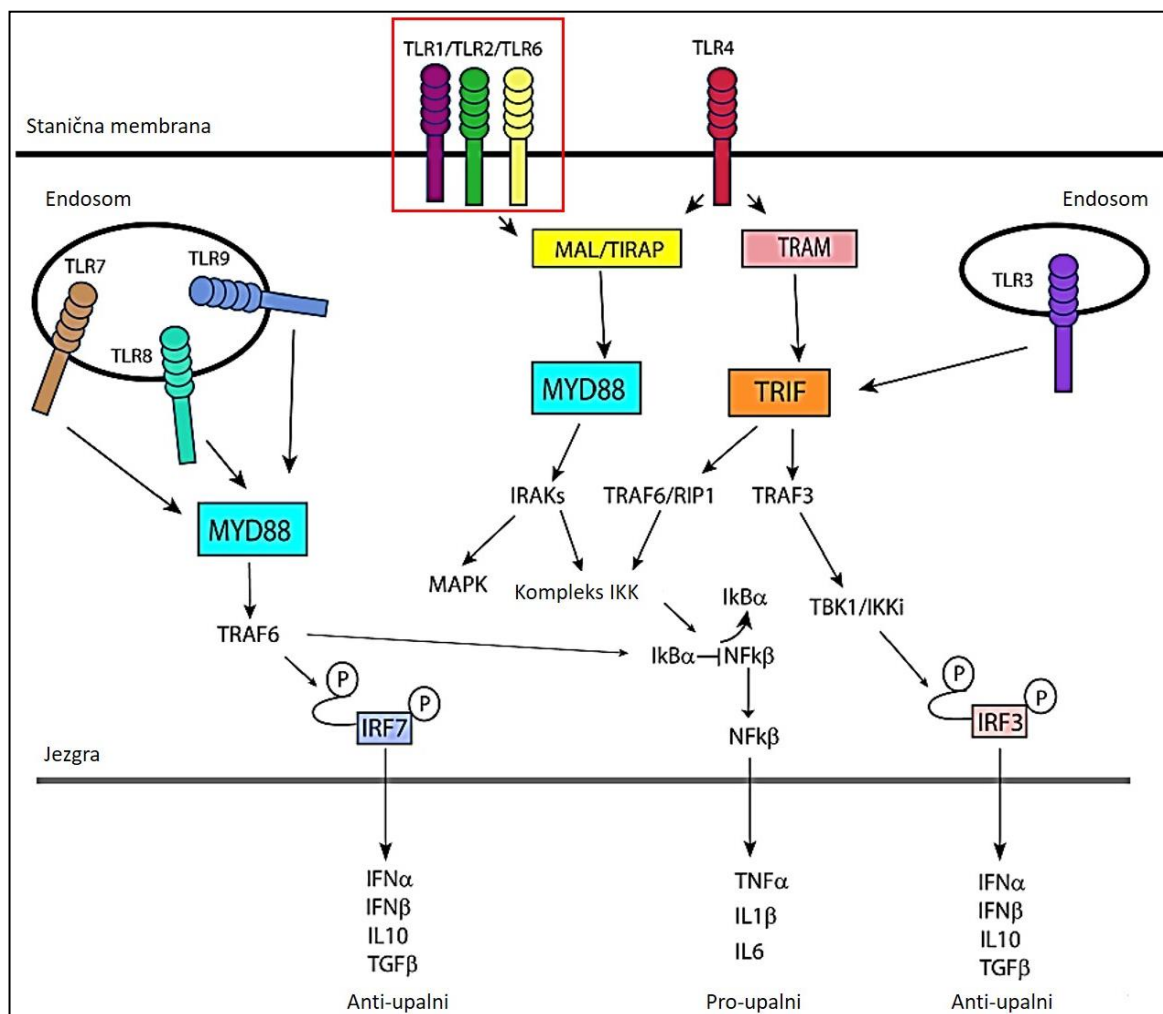
Receptori TLR se prema molekularnoj strukturi dijele u 6 grupa: TLR1/2/6/10, TLR3, TLR5, TLR7/8/9 i TLR11/12/13. Tijekom vezanja liganda formiraju se dimeri receptora TLR, a ovisno o vrsti receptori mogu formirati homodimere sastavljene od dva ista proteina ili heterodimere sastavljene od dvaju različitih vrsta receptora TLR. Receptor TLR2 na staničnoj membrani formira heterodimere s receptorima TLR1 i 6 te svaki heterodimer prepoznaje različite ligande (75). Kompleks TLR1/2 prepoznaje tri-acilirane lipoproteine, dok kompleks TLR2/6 prepoznaje di-acilirane lipoproteine, a vezanje liganda na receptor se stabilizira pomoću hidrofobnih interakcija te vodikovim vezama (75).

### **1.4.3. Signalni putevi receptora TLR**

Postoje dva signalna puta receptora TLR: signalni put ovisan o MyD88 i signalni put neovisan o MyD88. Svi receptori TLR pokreću signalni put ovisan o MyD88, dok je signalni put

neovisan o MyD88 (**Slika 3**) karakterističan samo za TLR3 i 4. Nakon dimerizacije domene TIR, dolazi do vezanja adaptera proteina MyD88 (MAL/TIRAP) te posljedično do vezanja MyD88. Protein MyD88 također sadrži domenu TIR kojom se veže na receptore TLR te domenu smrti koja se veže za ostale proteine iz signalne kaskade. Na domenu smrti proteina MyD88 vežu se proteini porodice IRAK (kinaza povezana s receptorom za interleukin 1, engl. *interleukin-1 receptor associated kinase*) čijom se aktivacijom pokreće signalni put posredovan kinazom MAPK, a dolazi i do aktivacije signalnog puta posredovanog transkripcijskim faktorom NF- $\kappa$ B. Degradacijom inhibitora I $\kappa$ B omogućava se translokacija NF- $\kappa$ B u jezgru. NF- $\kappa$ B se u jezgri veže na promotore gena što dovodi do transkripcije gena pro-upalnih citokina (*Tnf- $\alpha$* , *Il-6*, *Il-1 $\beta$* ). Također, protein MyD88 preko domene smrti može pokrenuti signalni put aktivacije procesa apoptoze (78).

Signalni put neovisan o MyD88 započinje vezanjem adaptor proteina TRAM (adapterska molekula povezana s TRIF, engl. *TRIF-related adaptor molecule*) i posljedično TRIF na domenu TIR receptora TLR (**Slika 3**). TRIF može pokrenuti dva različita signalna puta. Prvi signalni put rezultira aktivacijom NF- $\kappa$ B, na isti način kao i u signalnom putu ovisnom o MyD88, te dolazi do proizvodnje pro-upalnih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ). Aktivacijom TRAF3 (faktor povezan s faktorom nekroze tumora, engl. *tumor necrosis factor receptor associated factor 3*) započinje drugi signalni put koji putem aktivacije kompleksa TBK1/IKKi (kompleks kinaze koja veže TANK i kinaze inhibitora  $\kappa$ B, engl. *TANK-binding kinase 1/I $\kappa$ B kinase*) rezultira fosforilacijom IRF3 (regulatorni faktor interferona, engl. *IFN regulatory factor 3*) i njegovom translokacijom u jezgru. Kao rezultat ovog signalnog puta dolazi do izražaja interferona IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$  te anti-upalnih citokina IL-10 i TGF- $\beta$  (78).



**Slika 3:** Signalni putevi receptora iz porodice TLR. Signalni put posredovan MyD88 dovodi do aktivacije NF- $\kappa$ B i posljedično do transkripcije pro-upalnih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ), a mogu ga aktivirati svi receptori iz porodice TLR. S druge strane, signalni put neovisan o MyD88 može dovesti do transkripcije pro-upalnih citokina također putem aktivacije NF- $\kappa$ B, ali i do aktivacije TRAF3 koja rezultira proizvodnjom anti-upalnih citokina (IL-10, TGF- $\beta$ ). Signalni put neovisan o MyD88 karakterističan je jedino za TLR3 i 4. Preuzeto i prilagođeno prema (78).

#### 1.4.4. TLR2 u ishemijskom moždanom udaru

Mnoga istraživanja su se bavila ulogom receptora TLR u ishemijskom moždanom udaru (78). Receptori TLR vežu DAMP nakon moždanog udara te pokreću upalnu reakciju u središnjem živčanom sustavu. Analiza transkripcije gena iz porodice *Tlr* nakon ishemijske ozljede mozga pokazuje povećanje izražaja *Tlr2*, 4 i 9, s time da je izražaj *Tlr2* daleko najveći. Povećanje izražaja *Tlr2* vidljivo je već 3 h nakon ishemije, a izražaj je najveći nakon 24 h. Osim receptora

TLR2, nakon moždanog udara povećan je i izražaj gena koji sudjeluju u signalnom putu receptora TLR2 (79). Imunohistokemijskim bojenjem mišjeg mozga nakon moždanog udara pokazana je ko-lokalizacija receptora TLR2 isključivo s biljezima mikroglije. Izražaj TLR2 na astrocitima nakon ishemije nije opažen (80). Prostorna i vremenska dinamika izražaja receptora TLR nakon ishemijske lezije mišjeg mozga longitudinalno je praćena metodom *in vivo* bioluminiscencije. Pokazano je da upalni odgovor posredovan receptorom TLR2 ima kroničnu komponentu. Najveće povećanje izražaja *Tlr2* nastaje u akutnoj fazi, 2 dana nakon ishemije, a signal se smanji do 7. dana. Međutim, izražaj *Tlr2* ostaje značajno povećan tijekom 3 mjeseca nakon ishemijske lezije upućujući na prisutnost kronične upale (81). Izražaj receptora TLR2 nakon ishemijske lezije nalazi se u dvije regije: u području lezije te frontalno u olfaktornim bulbusima. Izražaj TLR2 u olfaktornim bulbusima povećava se 6 h nakon ishemije i perzistira tijekom kronične faze moždanog udara. S druge strane, izražaj TLR2 u području ishemijske lezije vidljiv je tek 12 h nakon okluzije. Ova opažanja ukazuju na moguću ulogu olfaktornih bulbusa u indukciji i regulaciji upalnih procesa posredovanih receptorom TLR2 nakon ishemijske lezije (81).

Nakon opisivanja uloge receptora TLR2 u procesu upale nakon moždanog udara, istraživanja su fokusirana na njegov utjecaj na volumen lezije i funkcionalni oporavak. U tu svrhu uspostavljeno je nekoliko modela inhibicije receptora TLR2: transgenične životinje (uglavnom miševi) kojima nedostaje gen *Tlr2*, farmakološka inhibicija receptora, utišavanje gena *Tlr2* pomoću snRNA (kratka nekodirajuća RNA, engl. *small non-coding RNA*) te prekondicioniranje receptora TLR2 agonistima prije izazivanja moždanog udara.

Istraživanje na TLR2 *knock-out* miševima pokazuje smanjenu aktivnost promotora gena *Tlr2* 3 i 7 dana nakon moždanog udara, ali nakon jednog mjeseca nedostatak proteinskog produkta nema utjecaj na povećanje izražaja promotora gena *Tlr2*. U akutnoj fazi dolazi do povećanja izražaja gena *Tlr2* u ipsilateralnoj i u kontralateralnoj hemisferi mozga (82). Ovi rezultati su dobiveni metodom qRT-PCR (kvantitativna lančana reakcija polimeraze s korakom reverzne transkripcije, engl. *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*) napravljenom na uzorcima mišjeg mozga. U istraživanju je korištena mišja linija kojoj je odstranjen dio gena *Tlr2* koji kodira za unutarstaničnu, transmembransku i dio izvanstanične domene receptora. Međutim, svejedno dolazi do transkripcije preostalog dijela gena *Tlr2* te nastaje skraćena mRNA. Ovako nastala mRNA translacijom ne daje funkcionalni proteinski produkt, ali može se koristiti za određivanje izražaja promotora gena *Tlr2* u uvjetima nedostatka proteinskog

produkta (82). Isti model TLR2 deficijencije korišten je u ovoj disertaciji. Iako se bazalna razina izražaja gena *Tlr2* nije promijenila nedostatkom proteinskog produkta, povećao se bazalni izražaj gena uključenih u TLR2 signalni put (*MyD88*, *Irak1*, *Irak3*, *Irak4*), pro-upalnih citokina (*Tnf*, *Il-6*) te gena uključenih u proces apoptoze (*Casp8*). Međutim, nakon moždanog udara povećanje izražaja ovih gena u odnosu na bazalne vrijednosti manje je kod miševa s nedostatkom receptora TLR2 nego kod životinja s funkcionalnim receptorom, upućujući na smanjeni proces upale uslijed nedostatka receptora TLR2 (82).

Istraživanja utjecaja TLR2 deficijencije na veličinu ishemijske lezije su većinom provedena na mišjim *knock-out* modelima te pokazuju oprečne rezultate. Većina istraživanja pokazuje da inhibicija receptora TLR2 dovodi do nastanka manje ishemijske lezije nakon moždanog udara (79, 83 - 86), ali jedno istraživanje dokazalo je suprotno (87). Nedostatak ovih istraživanja je korištenje jedne vremenske točke i to isključivo u akutnoj fazi ishemije, do 4 dana nakon moždanog udara. Kada je utjecaj nedostatka receptora TLR2 na veličinu ishemijske lezije praćen kroz dulje vrijeme, pokazalo se da u akutnoj fazi miševi s onemogućenim receptorom TLR2 imaju manje lezije (80). Međutim, u kroničnoj fazi, 7 i 14 dana nakon moždanog udara, dolazi do povećanja ishemijske lezije i većeg gubitka tkiva kod miševa s nedostatkom receptora TLR2. Ovo istraživanje pokazuje da receptor TLR2 ima kompleksnu ulogu u razvoju ishemijske lezije mozga te da njegov utjecaj na ishod ovisi vremenu proteklom nakon moždanog udara (80).

Uz veličinu lezije važan parametar za opisivanje ishoda moždanog udara je neurološki deficit. Većina nabrojanih istraživanja nije procjenjivala funkcionalne ishode poput neurološkog deficita ili su koristili vrlo oskudne protokole koji mjere isključivo jedan parametar. Miševi s onemogućenim receptorom TLR2 imaju bolji neurološki ishod u akutnoj fazi moždanog udara (83, 86), međutim istraživanje koje je pokazalo veću ishemijsku leziju kod miševa s onemogućenim TLR2 pokazuje bolji oporavak i veću stopu preživljenja miševa s aktivnim receptorom TLR2 (87). Kod miševa s nedostatkom receptora TLR2 nakon moždanog udara dolazi do povećanog izražaja *Gap43* (protein 43 povezan s rastom, engl. *growth associated protein 43*), biljega rasta aksona, tijekom kronične faze moždanog udara, međutim longitudinalnim praćenjem razvoja ishemijske lezije magnetskom rezonancijom nije uočena razlika u volumenu ishemijske lezije između miševa s TLR2 deficijencijom i miševa s funkcionalnim receptorom TLR2 (88). Najopsežnija neurološka procjena pokazuje da miševi s onemogućenim TLR2 imaju samo bolje preživljenje nakon moždanog udara u odnosu na

miševе s funkcionalnim receptorom. Nema razlike u neurološkom deficitu, gubitku tjelesne mase niti u ishodu senzomotornih testova tijekom 28 dana nakon moždanog udara (88).

Izlaganje životinja ligandima receptora TLR2 prije moždanog udara dovodi do pojačane aktivacije signalnog puta što ima neuroprotektivnu ulogu nakon izazivanja ishemije (89, 90). Otkriveni su mnogobrojni neuroprotektivni agensi koji između ostalog smanjuju izražaj receptora TLR2, a istovremeno dovode do razvoja manje ishemijske lezije (91 - 93). S obzirom na njegovu ključnu ulogu u aktivaciji upale posredovane stanicama mikroglije, receptor TLR2 jedan je od potencijalnih kandidata za razvoj novih terapija moždanog udara. Međutim, unatoč mnogobrojnim prekliničkim istraživanjima, uloga receptora TLR2 u moždanom udaru nije u potpunosti razjašnjena. U međuvremenu su razvijeni mnogobrojni antagonisti receptora TLR2 od kojih su neki već prošli prvu fazu kliničkih ispitivanja, a sve s ciljem njihove primjene u utišavanju raznovrsnih upalnih procesa, uključujući i upalu nakon moždanog udara (94, 95). Stoga, neophodno je detaljnije proučiti utjecaj receptora TLR2 na aktivaciju upalnog odgovora te posljedično na ishod moždanog udara.

## 1.5. Životinjski modeli ishemijskog moždanog udara

U proteklih nekoliko desetljeća razvijeno je mnoštvo životinjskih modela za preklinička istraživanja moždanog udara. Glavni cilj ovih istraživanja je otkrivanje mehanizama u patofiziološkoj pozadini moždanog udara te razvoj novih terapijskih pristupa. Životinjski modeli nezamjenjivi su u ovim istraživanjima zbog nekoliko razloga. Moždani udar kod ljudi ima veliku varijabilnost u simptomima, uzrocima i anatomskom položaju. Eksperimentalni modeli moždanog udara su reproducibilni, dobro kontrolirani i standardizirani čime se omogućava precizna analiza patofizioloških procesa tijekom moždanog udara te utjecaj lijekova na ishod (96). Zatim, proučavanje molekularnih, biokemijskih i fiziološki procesa često je invazivno i zahtjeva direktni pristup tkivu mozga. Patofiziološki procesi koji se odvijaju tijekom prvih minuta ishemije ne mogu se detektirati radiološkim snimanjima kod ljudi zbog čega se mogu proučavati isključivo na životinjskim modelima. Perfuzija mozga i kolaterale krvnih žila su ključne u patofiziologiji moždanog udara i ne mogu se proučavati na *in vitro* modelima (96).

Većina prekliničkih istraživanja moždanog udara provodi se na glodavcima (miševima i štakorima), iako su opisani modeli moždanog udara na mačkama, svinjama i primatima. Prednosti korištenje malih životinja kao modela u istraživanju moždanog udara su jeftinije održavanje i lakše usklađivanje s etičkim smjernicama i legislativama za provedbu pokusa na laboratorijskim životinjama (96). Najčešće se koristi štakorski model u istraživanju moždanog udara. Raspored cerebralnih krvnih žila i fiziologija štakora su slični ljudima. Veličina tijela štakora omogućava lakše praćenje fizioloških parametara, dok mu je mozak dovoljno malen za adekvatnu primjenu fiksacijskih postupaka nakon izolacije tkiva. Uočena je velika homogenost rezultata unutar sojeva što posljedično omogućava dobru reproducibilnost studije (96). Miševi su mnogo manji pa je zahtjevnije pratiti fiziološke parametre nakon moždanog udara. Međutim, prednost predstavlja činjenica da je mišji genom sekvenciran te su uspostavljene metode modifikacije mišjeg genoma koje su rezultirale razvojem mnogobrojnih sojeva genetički modificiranih miševa. Genetički modificirani miševi predstavljaju nezamjenjiv model u istraživanju utjecaja pojedinih gena na ishod moždanog udara (96). Smjernice za istraživanje moždanog udara na životinjskim modelima preporučuju da se učinkovitost tretmana testiran na nekoliko različitih vrsta životinja i različitim metodama izazivanja moždanog udara prije nego što se translatira u klinička ispitivanja (97).

### 1.5.1. Metode izazivanja ishemije mozga u pretkliničkim istraživanjima

Najčešće korišteni modeli u pretkliničkom istraživanju moždanog udara su intraluminalni model okluzije srednje moždane arterije, model kraniotomije, fototromboza, model posredovan endotelinom-1 i embolijski model moždanog udara (96). Svaki od navedenih modela ima svoje prednosti i nedostatke, a konačni odabir ovisi o svrsi istraživanja. Intraluminalni model okluzije srednje moždane arterije će biti detaljnije opisan s obzirom da je primijenjen u ovoj disertaciji.

Metoda intra-arterijske okluzije srednje moždane arterije (MCAO, engl. *middle cerebral artery occlusion*) pomoću silikonskog filameta najčešće je korištena metoda izazivanja ishemijskog moždanog udara kod glodavaca. Kod ljudi okluzija srednje moždane arterije ili njenih ogranaka najčešći je uzrok ishemijskog moždanog udara (98). Model MCAO je neinvazivan, s obzirom da se krvnim žilama pristupa rezom na vratu model ne zahtijeva kraniotomiju. U ovom modelu silikonski filament se umeće u ishodište srednje moždane arterije (MCA, engl. *middle cerebral artery*) kroz unutarnju karotidnu arteriju (ICA, engl. *internal carotid artery*). Postoje dvije varijante ove metode. Prema Koizumi metodi, silikonski filament umeće se u lumen zajedničke karotidne arterije (CCA, engl. *common carotid artery*) kroz koju ulazi u ICA i prolazi dalje do račvišta MCA (99). Kod Longa metode filament se uvodi kroz vanjsku karotidnu arteriju (ECA, engl. *external carotid artery*) u ICA i dalje do ishodišta MCA (100). U ovoj disertaciji korištena je Koizumi metoda okluzije MCA. Obje metode se mogu primijeniti za prolaznu (tranzitornu, tMCAO) i trajnu okluziju (pMCAO) MCA. Kod miševa MCAO metoda dovodi do razvoja velike ishemijske lezije koja pokriva veći dio zahvaćene hemisfere, uključujući većinu moždane kore, strijatum, talamus, hipokampus i subventrikularnu zonu. Veličina i lokalizacija područja zahvaćenog ishemijom ovisi o trajanju okluzije te o veličini filameta (101, 102). Uočene su razlike u veličini ishemijske lezije kod pojedinih sojeva miševa, a smatra se da dolazi do takvih razlika zbog različite anatomske građe arterijskih kolaterala. Nadalje, starost i težina životinja imaju ključni utjecaj na varijabilnost intraluminalnog promjera arterija (103). Prednosti korištenja ove metode su reproducibilno izazivanje velikih ishemijskih lezija, postojanje penumbre te mogućnost preciznog kontroliranja vremena okluzije i reperfuzije. MCAO je dobar model za proučavanje odumiranja neurona, upalnih procesa, oštećenja krvno-moždane barijere i funkcionalnog oporavka, te je tehnička izvedba jednostavnija u odnosu na ostale modele moždanog udara (98). Međutim, ova metoda može dovesti do neadekvatne ishemije ili krvarenja, pogotovo ako se ne koriste filamenti ispravne veličine. Ishemijska lezija često je prisutna u području hipokampusa što kod ljudi nije slučaj. Kod tMCAO modela sekundarno oštećenje kod miševa nastupa 12 h nakon reperfuzije, a ovako veliki terapijski prozor ne



postoji kod ljudi. Tijekom pMCAO ishemijska jezgra se širi periferno na okolno tkivo te doseže maksimum oko 3 h nakon okluzije. Zbog navedenih patofizioloških razlika između tMCAO i pMCAO dolazi do neusklađenosti rezultata prilikom istraživanja efikasnosti terapije. Ovaj model također nije prikladan za istraživanje trombolize gdje dolazi do postepenog uspostavljanja reperfuzije (104).

### **1.5.2. Metode validacije ishemijske lezije na životinjskim modelima**

Prisutnost ishemijske lezije na životinjskim modelima može se validirati na dva načina: histološkom analizom mozga *post mortem* te metodama *in vivo* snimanja. Starija istraživanja koristila su isključivo histološke metode za dokazivanje prisutnosti ishemijske lezije. Najčešće korištene histološke tehnike za bojenje mozga i određivanje veličine ishemijske lezije su: hematoksilin-eozinsko bojenje, bojenje srebrom, TTC (2,3,5-trifeniltetrazolij hidroklorid) bojenje, bojenje prema Nisslu i imunohistokemijsko bojenje korištenjem antitijela za MAP2 (protein povezan s mikrotubulima, engl. *microtubule-associated protein 2*) ili NeuN (antigen neuronskih jezgara, engl. *neuronal nuclear antigen*). Ovim tehnikama može se dobro vizualizirati i kvantificirati veličina ishemijske lezije (105). Međutim, fiksacija i rezanje tkiva onemogućava kombiniranje ovih tehnika s ostalim *in vitro* postupcima na tkivu kao što su izolacija proteina, RNA ili DNA te izolacija pojedinačnih stanica za protočnu citometriju.

Tehnološki napredak metoda *in vivo* snimanja doveo je do njihove primjene na laboratorijskim životinjama što prije nije bilo moguće zbog male veličine tijela glodavaca. Primjena ovih neinvazivnih metoda omogućila je longitudinalno praćenje progresije ili regresije raznih poremećaja, uključujući i volumen ishemijske lezije (106). Nadalje, ove metode doprinijele su smanjenju broja životinja potrebnih u istraživanju. Kod ponovljenih mjerenja potreban je manji broj životinja za dobivanje statistički značajnih rezultata, a dolazi i do smanjenja broja eksperimentalnih skupina s obzirom da snimanja prije intervencije mogu zamijeniti zasebnu kontrolnu skupinu. Tijekom pokusa može se kombinirati više metoda *in vivo* snimanja čime se istovremeno prati više procesa (106). Nedostatak ovih metoda je opetovano izlaganje laboratorijskih životinja anesteziji tijekom snimanja. Najčešće metode koje se koriste za *in vivo* snimanje ishemijske lezije na mišjem modelu su MRI, CT, PET (pozitronska emisijska tomografija, engl. *positron emission tomography*) i SPECT (kompjuterizirana tomografija posredovana emisijom jednog fotona, engl. *single-photon emission computerized tomography*)

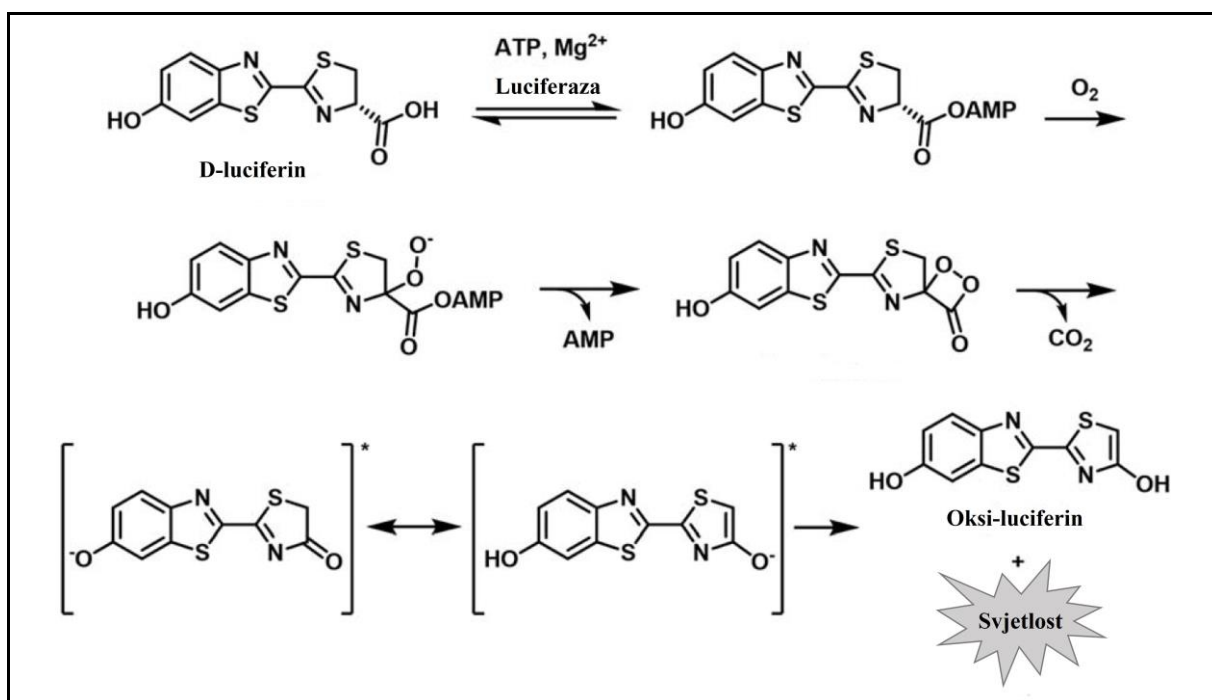
koji kombinira metode PET i CT (105). S obzirom da je ovom istraživanju razvoj ishemijske lezije praćen magnetskom rezonancijom, ova metoda će biti detaljnije opisana.

Snimanje magnetskom rezonancijom bazirano je na efektu koji magnetsko polje ima na protone vodika. Prilikom snimanja primjenjuje se magnetsko polje koje uzrokuje poravnanje protona vodika u paralelnoj ili anti-paralelnoj orijentaciji u odnosu na smjer magnetska polja. Protoni prilikom vraćanja iz anti-paralelne u paralelnu orijentaciju otpuštaju energiju (zračenje) u području radiovalova koju detektiraju zavojnice za primanje signala te ga pretvaraju u sliku. Prednost MRI-a je što ne koristi ionizirajuće zračenje nego otpušta radiovalove za koje se smatra da nemaju štetni učinak na tkivo (107). Razvoj ishemijske lezije mozga vrlo je dinamičan proces te se fizikalna svojstva zahvaćenog tkiva mijenjaju tijekom vremena, stoga odabir metode snimanja MRI-a ovisi o vremenu proteklom nakon nastanka moždanog udara. U ranoj akutnoj fazi (do 12h nakon ishemije) ishemijska lezija se vizualizira snimanjem difuzije molekula vode metodom DWI (snimanje kontrastiranjem difuzije, engl. *diffusion-weighted imaging*) i cerebralnog protoka krvi metodom PWI (snimanje efekta perfuzije, engl. *perfusion-weighted imaging*). Također, pokazano je da se kombiniranjem ovih snimki može odrediti područje penumbre (108). Metodom MRI angiografije (MRA) se vizualiziraju okludirane krvne žile. Dobivaju se informacije o morfologiji krvnih žila, njihovoj gustoći u tkivu i promjeru lumena. MRA se snima u svim fazama moždanog udara, od rane akutne do kronične (109). U kasnijoj akutnoj fazi, tijekom nekoliko dana nakon moždanog udara, ishemijska lezija prati se pomoću snimki tipa T2, a za još bolji kontrast između lezije i nezahvaćenog tkiva se snima T2 mapa. Snimka tipa T2 jako je osjetljiva na vazogeni edem koji je glavno obilježje ishemijske lezije tijekom prvih nekoliko dana nakon okluzije. Osim ishemijske lezije, snimkama tipa T2 vizualiziraju se malformacije nastale prilikom neuspješnog MCAO zahvata, npr. hemoragije, hemoragijske transformacije ishemijske lezije te izostanak ishemijske lezije (110). Tijekom kronične faze izraženi su mehanizmi plastičnosti mozga. Za praćenje procesa propadanja i regeneracije aksona nakon moždanog udara se koristi DTI (snimanje tenzora difuzije, engl. *diffusion tensor imaging*). Promjene na DTI snimkama koreliraju s rezultatima histološke analize mozga (111). Signal na funkcionalnom MRI-u (fMRI) ovisi o količini oksihemoglobina koji je indirektna mjera aktivnosti neurona u pojedinim regijama mozga. Ova metoda omogućava vizualizaciju područja zahvaćenih gubitkom neurona nakon moždanog udara (112). Osim za snimanje ishemijske lezije, MRI se može primijeniti i za praćenje određenih procesa ishemijske kaskade. Promjene propusnosti krvno-moždane barijere nakon moždanog udara prate se korištenjem kontrastnog agensa gadolinija na snimkama tipa T1, a proces upale nakon

ishemijske lezije se prati pomoću čestica željezovog oksida – SPIO (male čestice supermagnetskih oksida željeza, engl. *small superparamagnetic iron oxides*) (113). Nakon ubrizgavanja u krv, čestice SPIO fagocitiraju makrofagi koji se zatim nakupljaju u mjestu upale i pokazuju signal na MRI-u (114).

### 1.5.3. Primjena *in vivo* bioluminiscencije u istraživanju moždanog udara

*In vivo* snimanje bioluminiscencije (BLI, engl. *bioluminescent imaging*) neinvazivna je metoda koja omogućuje longitudinalno praćenje patofizioloških procesa na laboratorijskim životinjama, a u istraživanjima ishemijskog moždanog udara može se kombinirati s ostalim neinvazivnim metodama snimanja (npr. s MRI-em). Bioluminiscencija je fenomen emisije svjetla iz živih organizama, a posredovana je kemijskom reakcijom oksidacije luciferina u oksiluciferin pomoću enzima luciferaze uz prisutnost ATP-a i kisika. Kao nusprodukt ove reakcije dolazi do otpuštanja fotona valne duljine 560 nm (**Slika 4**) (115).



**Slika 4:** Prikaz kemijske reakcije oksidacije luciferina u oksiluciferin koja je odgovorna za fenomen bioluminiscencije. Reakcija je posredovana enzimom luciferazom iz krijesnice te je za uspješnost reakcije neophodan ATP i kisik. Kao nusprodukt reakcije dolazi do otpuštanja fotona (svjetlosti) koji se kvantificiraju tijekom snimanja bioluminiscencije. Preuzeto i prilagođeno prema (116).

Prilikom snimanja BLI u laboratoriju, koriste se CCD (nabojem spregnuti sklop, engl. *charged-coupled device*) kamere koje hvataju otpuštene fotone i generiraju sliku prostorne raspodjele i gustoće fotona. Bioluminiscencija je karakteristična za mnogobrojne organizme, od bakterija do kukaca, a nekoliko sustava luciferin-luciferaza primjenjuje se u znanstvenim istraživanjima kao molekularni biljeg za praćenje pojedinih procesa (115). Najčešće korišteni sustav bioluminiscencije je iz krijesnice *Photinus pyralis*, a primijenjen je i u ovoj disertaciji. Napravljeni su mnogi sojevi miševa koji imaju ugrađen transgen luciferaze. Izražaj luciferaze ovisi o aktivnosti promotora pod kojim je ugrađena, a ukoliko promotor nije aktivan ne dolazi do izražaja luciferaze. Stoga, u ovom modelu luciferaza služi kao molekularni biljeg izražaja gena od interesa. Transgenični miševi s luciferazom emitiraju svjetlost isključivo nakon ubrizgavanja otopine D-luciferina, a s obzirom da su za reakciju potrebni kisik i ATP, BLI se snima na živim životinjama ili *ex vivo* na svježe izoliranom tkivu (117). BLI se koristi za analizu izražaja gena, praćenje migracije stanica, analizu staničnih interakcija te za ispitivanje efikasnosti lijekova. Prednosti korištenja BLI za snimanje transgeničnih miševa su minimalni pozadinski signal, velika osjetljivost, zadovoljavajuća prostorna rezolucija i jednostavna kvantifikacija signala. D-luciferin je netoksičan i prolazi kroz krvno-moždanu barijeru što omogućava njegovu primjenu u istraživanju središnjeg živčanog sustava (115). Nedostatak BLI je nemogućnost prolaska signala kroz tkivo veće debljine, jer se na svakih 1 cm debljine tkiva signal smanjuje 10 puta. BLI se najčešće snima u dvije dimenzije čime dolazi do utišavanja signala iz dubljih slojeva tkiva. Međutim, ovaj efekt nije toliko izražen na miševima s obzirom na male dimenzije njihovog tijela (118).

Bioluminiscencija se primjenjuje u istraživanju raznovrsnih procesa upale nakon moždanog udara te u kroničnoj fazi za proučavanje oporavka tkiva. Tako je npr. metodom BLI vizualizirana M1/M2 polarizacija mikroglije (119), infiltracija makrofaga u tkivo mozga (120) i reaktivna astrogliozna praćenjem izražaja *Gfap* (121) nakon moždanog udara. Mišja linija s bioluminiscentnim biljegom za praćenje izražaja receptora TLR2 dobro je okarakterizirana i primijenjena u mnogim istraživanjima moždanog udara. Ova istraživanja potvrđuju da je izražaj promotora gena *Tlr2* praćen metodom *in vivo* bioluminiscencije dobar biljeg upale posredovane mikroglijom nakon moždanog udara kod miševa (81, 122, 123). Nadalje, proces apoptoze i oporavak mozga nakon moždanog udara simultano su praćeni bioluminiscencijom putem izražaja gena *Gap43* uz korištenje zatočenog oblika luciferina (88, 124). Vaskularne promjene nakon moždanog udara su vizualizirane korištenjem mišje linije s izražajem luciferaze pod promotorom gena *Vegf* (125). Bioluminiscencija je također primijenjena i za praćenje migracije

matičnih stanica injektiranih u tkivo miša nakon ishemijskog moždanog udara što omogućuje validaciju efikasnosti terapije (126).

## **2. HIPOTEZA**

Izražaj receptora TLR2 praćen metodom *in vivo* bioluminiscencije povezan je s obilježjima i dinamikom upale nakon ishemijske lezije kod miševa.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog istraživanja bio je odrediti obilježja i vremensku dinamiku upalne reakcije posredovane receptorom TLR2 nakon ishemijske lezije mišjeg mozga te odrediti njihovu povezanost s izražajem receptora TLR2 i volumenom ishemijske lezije.

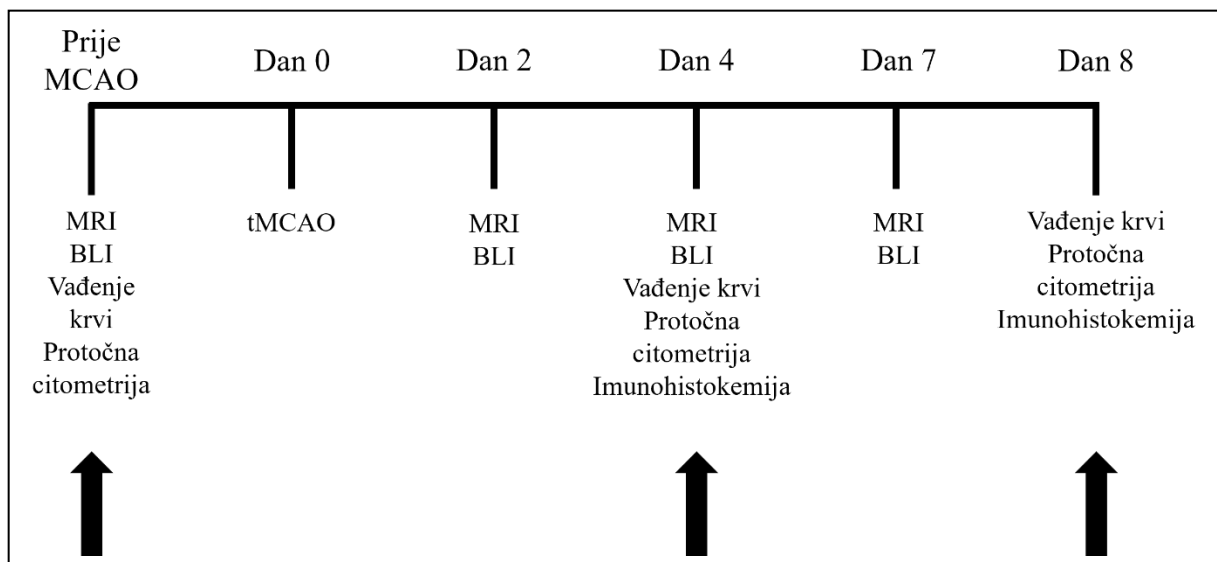
Specifični ciljevi su:

1. Uzgojiti i okarakterizirati novu mišju liniju s nedostatkom funkcionalnog receptora TLR2 i istovremenim izražajem luciferaze pod kontrolom promotora gena *Tlr2* (C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri</sup>-Tlr2<sup>tm1Kir/Gaj</sup>).
2. Pratiti promjenu izražaja gena *Tlr2* *in vivo* bioluminiscencijom tijekom 7 dana nakon tMCAO kod miševa s funkcionalnim receptorom TLR2 koji izražavaju luciferazu pod kontrolom promotora gena *Tlr2* (C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri/Gaj</sup>) i kod miševa kojima nedostaje receptor TLR2, a istovremeno izražavaju luciferazu pod kontrolom promotora gena *Tlr2* (C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri</sup>-Tlr2<sup>tm1Kir/Gaj</sup>).
3. Pratiti promjenu veličine ishemijske lezije *in vivo* tijekom 7 dana nakon tMCAO pomoću MRI-a kod miševa C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri/Gaj</sup> i C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri</sup>-Tlr2<sup>tm1Kir/Gaj</sup>.
4. Protočnom citometrijom odrediti broj stanica mikroglije te udio mikroglije koji izražava receptor TLR2 prije i nakon tMCAO, kod miševa C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri/Gaj</sup> i C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri</sup>-Tlr2<sup>tm1Kir/Gaj</sup>.
5. Odrediti koncentraciju biljega upale u krvnoj plazmi kod miševa C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri/Gaj</sup> i C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri</sup>-Tlr2<sup>tm1Kir/Gaj</sup> prije i nakon tMCAO.
6. Odrediti povezanost između intenziteta signala dobivenog bioluminiscencijom i veličine ishemijske lezije mišjeg mozga.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Dizajn istraživanja i broj životinja

U ovom istraživanju korištene su metode *in vivo* oslikavanja mišjeg mozga kako bi se longitudinalno pratio razvoj ishemijske lezije te proces upale nakon moždanog udara. Utjecaj receptora TLR2 na ishod moždanog udara određen je korištenjem mišjeg soja s nedostatkom funkcionalnog receptora TLR2 (Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc)) te su rezultati uspoređeni s miševima koji izražavaju funkcionalni receptor TLR2 (Wt(Tlr2-luc)). Ishemijska lezija mišjeg mozga napravljena je metodom prolazne okluzije srednje moždane arterije, tMCAO. Volumen ishemijske lezije longitudinalno je praćen magnetskom rezonancijom, a aktivnost promotora gena *Tlr2*, koji je u ovom istraživanju bio mjera upale u mozgu, metodom *in vivo* bioluminiscencije. Koncentracija upalnih biljega u krvnoj plazmi nakon ishemijske ozljede mozga određena je metodom višestruke ELISA (enzimski ovisan imunosorbentni serološki test, engl. *enzyme-linked-immunosorbent serologic assay*) reakcije, a izražaj dodatnih biljega upale u mozgu određen je metodama protočne citometrije i imunohistokemije. Dizajn istraživanja shematski je prikazan na **Slici 5**.



**Slika 5:** Shematski prikaz tijeka istraživanja s rasporedom korištenja pojedinih metoda po vremenskim točkama. Strelice označavaju vremenske točke u kojima su životinje bile žrtvovane.



Ukupni broj životinja korištenih u provedbi pokusa opisanih u ovoj disertaciji iznosio je 123. U pokuse je bilo uključeno 106 životinja, dok je ostalih 17 isključeno iz istraživanja. Dvije životinje su isključene prije izvođenja tMCAO operacije jer su na snimkama magnetske rezonancije uočene kongenitalne deformacije mozga (2 Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc)). Nadalje, 4 životinje su isključene zbog hemoragije u mozgu nakon tMCAO (1 Wt(Tlr2-luc) i 3 Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc)), a 11 životinja nije razvilo ishemijsku leziju (6 Wt(Tlr2-luc) i 5 Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc)). Od ukupno 106 životinja uključenih u pokuse njih 20 (10 Wt(Tlr2-luc) i 10 Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc)) žrtvovano je prije tMCAO za potrebe protočne citometrije. Kod 79 životinja (37 Wt(Tlr2-luc) i 42 Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc)) izazvana je ishemijska lezija mozga te su bile podvrgnute višestrukom snimanju magnetskom rezonancijom i bioluminiscencijom uz procjenu neurološkog deficita u svim vremenskim točkama. Od životinja koje su bile podvrgnute metodama *in vivo* snimanja nasumično je odabrano 15 životinja svakog soja kojima je vađena krv za procjenu koncentracije citokina u krvnoj plazmi metodom višestruke ELISA reakcije. Nadalje, sve životinje koje su doživjele krajnju vremensku točku pokusa (4. ili 8. dan nakon tMCAO) u konačnici su žrtvovane za potrebe protočne citometrije ili imunohistokemije. Detaljniji opis broja životinja korištenih za pojedine metode nalazi se u **Tablici 1**. Broj životinja u eksperimentalnim skupinama za potrebe metoda *in vivo* snimanja (magnetska rezonancija i bioluminiscencija) bio je određen analizom snage prije početka istraživanja.

Također, preostalih 7 Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) životinja bilo je podvrgnuto lažnoj (sham) operaciji. Te životinje su prije zahvata te dva dana nakon sham operacije snimane magnetskom rezonancijom i bioluminiscencijom.

**Tablica 1:** Prikaz broja životinja korištenih za pojedine metode. Obojena polja označavaju da su za te metode korišteni isti miševi u svim vremenskim točkama. Miševima koji su bili podvrgnuti postupcima *in vivo* snimanja istovremeno je vađena krv za potrebe višestruke ELISA reakcije, a na kraju pokusa su žrtvovani za potrebe imunohistokemije i protočne citometrije.

Postupak	Vremenska točka					
	Prije tMCAO	Dan 0	Dan 2	Dan 4	Dan 7	Dan 8
Sham operacija		7 Tlr2-/- (Tlr2-luc)				
tMCAO		37 Wt(Tlr2-luc) 42 Tlr2-/- (Tlr2-luc)				
Procjena tjelesne težine						
Neurološki deficit	37 Wt(Tlr2-luc)					
Magnetska rezonancija	42 Tlr2-/- (Tlr2-luc)					
Snimanje bioluminiscencije						
Višestruka ELISA	15 Wt(Tlr2-luc) 15 Tlr2-/- (Tlr2-luc)			15 Wt(Tlr2-luc) 15 Tlr2-/- (Tlr2-luc)		12 Wt(Tlr2-luc) 12 Tlr2-/- (Tlr2-luc)
Protočna citometrija	10 Wt(Tlr2-luc) 10 Tlr2-/- (Tlr2-luc)			10 Wt(Tlr2-luc) 8 Tlr2-/- (Tlr2-luc)		10 Wt(Tlr2-luc) 11 Tlr2-/- (Tlr2-luc)
Imunohistokemija				5 Wt(Tlr2-luc) 5 Tlr2-/- (Tlr2-luc)		4 Wt(Tlr2-luc) 4 Tlr2-/- (Tlr2-luc)
Ukupni broj životinja uključenih u pokuse: 106, 47 Wt(Tlr2-luc) i 59 Tlr2-/- (Tlr2-luc)						

Kriteriji za isključivanje životinja iz istraživanja su bili sljedeći:

a) Prije tMCAO zahvata:

1. Ponašanja prije tMCAO koja ukazuju na neurološke smetnje
2. Opsežne ozljede krzna ili repa radi sukoba s drugim miševima iz kaveza
3. Deformacije mozga uočene na MRI snimkama prije tMCAO zahvata (obuhvaća razvojne deformacije mozga, hemoragije te ostale ne-fiziološke promjene tkiva)

b) Nakon tMCAO:

1. Opsežno krvarenje tijekom tMCAO zahvata
2. Izostanak ishemijske lezije na MRI snimkama dva dana nakon tMCAO
3. Prisutnost krvarenja u mozgu uočena na MRI snimkama
4. Hemoragijska transformacija ishemijske lezije mozga u bilo kojoj vremenskoj točki
5. Izostanak voljnih reakcija na podražaj
6. Nesposobnost uspravljanja
7. Nesposobnost kretanja
8. Nesposobnost uzimanja hrane ili vode

Zadnja četiri kriterija definirana su kao dosezanje humane krajnje točke (127). Sve životinje isključene iz pokusa bile su bezbolno žrtvovane metodom cervikalne dislokacije.

Životinje su bile označene oznakama na uškama te im je pridružena pisana oznaka i broj pod kojim su se vodile u evidenciji Laboratorija za regenerativnu neuroznanost (LZRN oznake). Također, miševima su vodootpornim markerom napravljene oznake na repu koje ne odaju njihovu genetičku podlogu radi lakšeg raspoznavanja. Vremenska točka žrtvovanja životinja (dan 4 ili dan 8 nakon MCAO) i *in vivo* metoda (imunohistokemija ili protočna citometrija) za koju su korištene pojedine životinje bila je definirana prije početka pokusa za tu skupinu životinja s ciljem smanjenja pristranosti.

## 4.2. Pokusne životinje

### 4.2.1. Usklađenost s etičkim smjernicama i zakonskim propisima

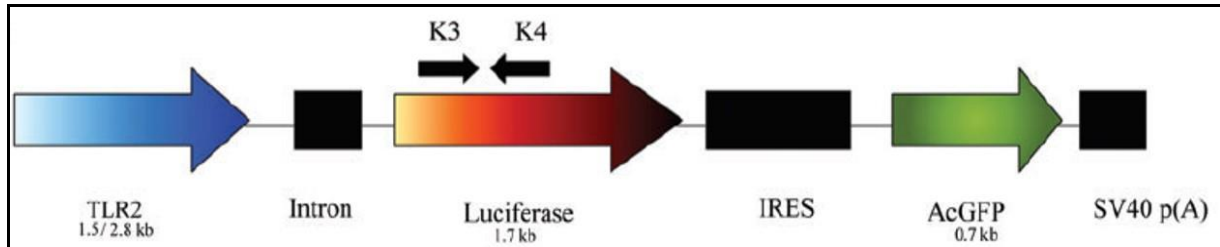
Istraživanje na životinjama provedeno je u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/17, 32/19), Izmjenama i dopunama Zakona o zaštiti životinja (NN 37/13) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13) te sukladno etičkim standardima za provedbu istraživanja u Nastambi za laboratorijske životinje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga (HR-POK-006). Istraživanje je provedeno u okviru HRZZ projekta RepairStroke (IP-2016-06-1892) za koji je izdana etička dopusnica od strane Ministarstva poljoprivrede, Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane (KLASA: UP/I-322-01/17-01/45; URBROJ: 525-10/0255-17-7; 9.10.2017.) te Mišljenje etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (KLASA: 641-01/17-02/01; URBROJ: 380-59-10106-17-100/100; 23.3.2017.). Sanja Srakočić je završila tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama, LabAnim B kategorija, te posjeduje dozvolu za rad s laboratorijskim životinjama broj 247.3-19, HR191/02/P.

### 4.2.2. Mišje linije

Istraživanje je provedeno na dvije mišje linije: C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri/Gaj</sup> (dalje u tekstu označeni kao Wt(Tlr2-luc)) i C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri/Gaj</sup>-Tlr2<sup>tm1 Kir/Gaj</sup> (dalje označeni kao (Tlr2-/(Tlr2-luc)). Miševi su bili muškog spola, starosti između 12-16 tjedana i težine 23-28 g. Tijekom provođenja pokusa svi miševi u pokusnoj skupini bili su smješteni u istoj prostoriji za smještaj životinja u jednom individualno ventiliranom kavezu. U pokusnoj skupini bilo je 5-8 miševa, a sveukupno u istraživanju je bilo 19 skupina pokusa. Prostorija za smještaj pokusnih životinja imala je kontrolu temperature ( $22 \pm 2$  °C) i vlage, te 12/12-satni ciklus izmjene svjetla i tame. Hrana i voda bili su dostupni *ad libitum* tijekom cijelog pokusa.

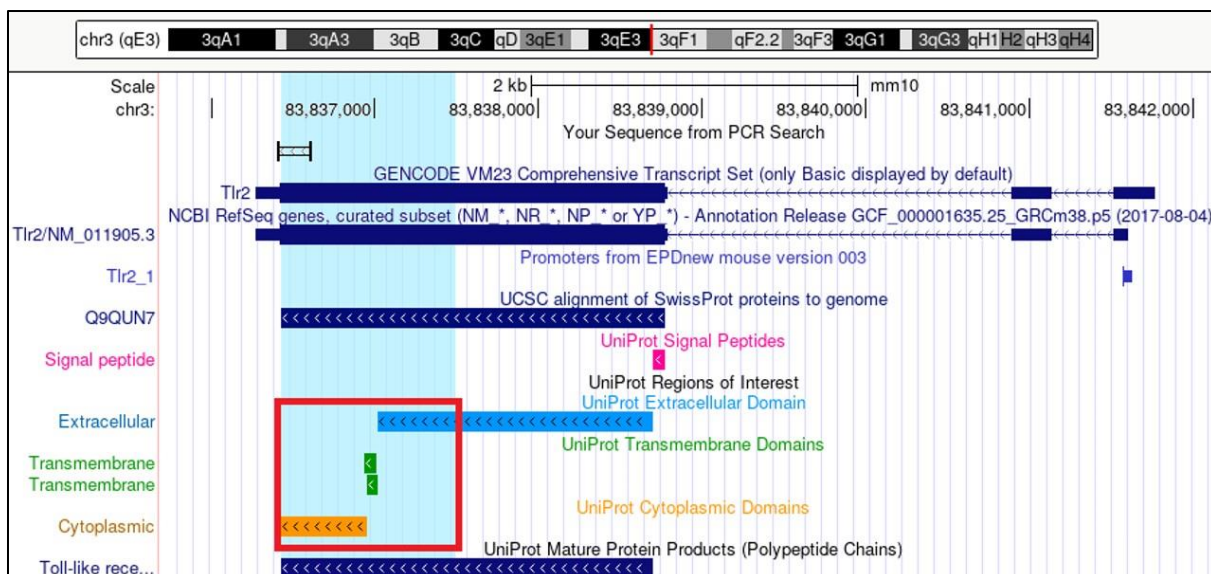
C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri/Gaj</sup> je linija C57BL/6 miševa albino fenotipa u koju je ugrađen transgenični konstrukt (Tlr2-luc/gfp) koji pod promotorom gena *Tlr2* izražava luciferazu (luc) i zeleni fluorescentni protein (gfp) (**Slika 6**). Dobivanje ove mišje linije opisano je u (81), te ju je na korištenje ustupila prof. dr. sc. Jasna Križ sa Sveučilišta Laval, Québec, Kanada. Ovi miševi su heterozigoti za navedeni transgenični konstrukt te imaju funkcionalni TLR2 receptor. Uzgajaju se sparivanjem heterozigotnih nositelja transgeničnog konstrukta i linije albino miševa C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd/J</sup> koja nije nositelj konstrukta. Linija je korištena u ovom

istraživanju radi longitudinalnog praćenja izražaja promotora gena *Tlr2*, koji je pokazivao intenzitet upale nakon moždanog udara kod miševa s funkcionalnim TLR2 receptorom.

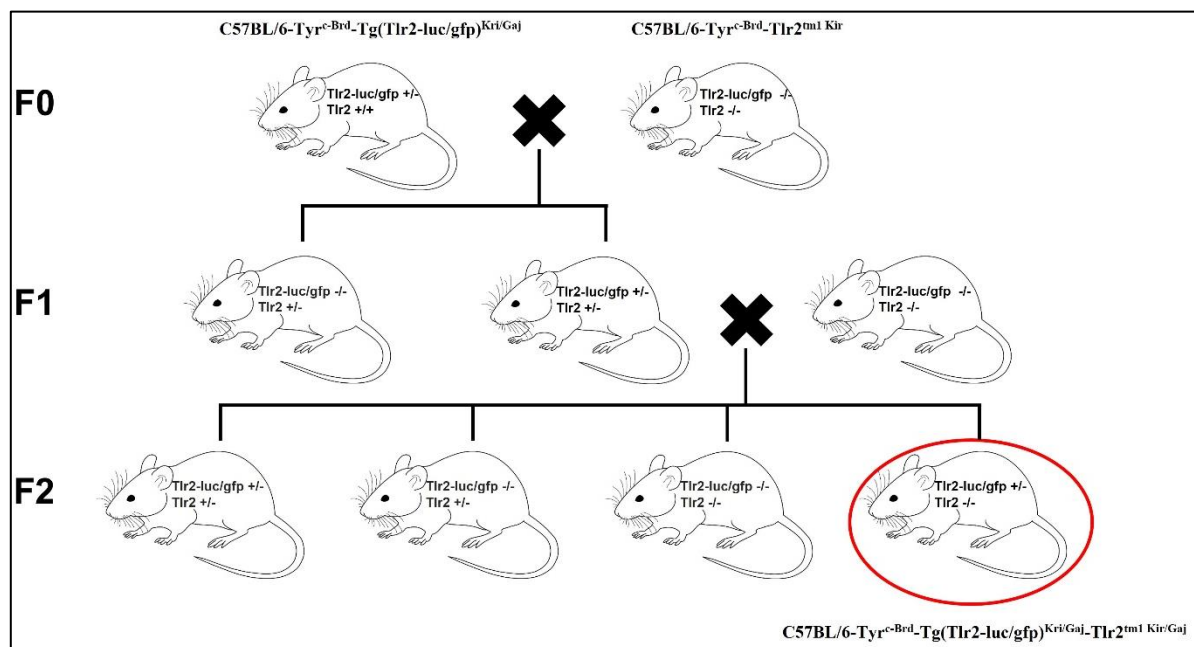


**Slika 6:** Shematski prikaz genskog konstrukta mišje linije C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri/Gaj</sup>. Pod promotorom gena *Tlr2* dolazi do izražaja bioluminiscentnog biljega luciferaze i fluorescentnog biljega zelenog fluorescentnog proteina. Genski konstrukt ugrađen je u genom miša nasumičnom insercijom u nepoznati lokus. Preuzeto i prilagođeno prema (81).

C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri/Gaj</sup>-Tlr2<sup>tm1Kir/Gaj</sup> je linija C57BL/6 miševa albino fenotipa u koju je ugrađen transgenični konstrukt (Tlr2-luc/gfp) koji pod promotorom gena *Tlr2* izražava luciferazu i zeleni fluorescentni protein (**Slika 6**), a istovremeno mu nedostaje funkcionalni protein TLR2. Uklonjen je dio genoma koji kodira za citoplazmatsku, transmembransku i dio izvanstanične domene receptora TLR2 (**Slika 7**) čime nastaje nefunkcionalni protein. Međutim, svejedno dolazi do izražaja transgena (Tlr2-luc/gfp) s obzirom da promotor gena *Tlr2* ostaje funkcionalan unatoč nedostatku proteinskog produkta (82). Ova mišja linija uzgojena je na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga specifično za potrebe ove disertacije. Linija je dobivena sparivanjem miševa C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri/Gaj</sup>, koji su nositelji transgeničnog konstrukta s luciferazom, s linijom C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tlr2<sup>tm1Kir/Gaj</sup> kojoj nedostaje funkcionalni receptor TLR2, kako je malo prije opisano. Miševi željenog genotipa su dobiveni u drugoj generaciji (**Slika 8**), a zatim su sparivani tijekom 5 generacija prije nego što su korišteni za pokuse. Ovi miševi su heterozigoti za konstrukt Tlr2-luc/gfp te nemaju funkcionalni receptor TLR2. Novo-dobivena linija C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri/Gaj</sup>-Tlr2<sup>tm1Kir/Gaj</sup> uzgaja se sparivanjem heterozigotnih nositelja transgena C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri/Gaj</sup>-Tlr2<sup>tm1Kir/Gaj</sup> s linijom kojoj nedostaje funkcionalni receptor TLR2: C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tlr2<sup>tm1Kir/Gaj</sup>. Linija je korištena u ovom istraživanju radi longitudinalnog praćenja izražaja promotora gena *Tlr2* uz nedostatak proteinskog produkta.



**Slika 7:** Prikaz dijela mišjeg genoma koji kodira za receptor TLR2. Crvenim pravokutnikom je označen dio gena *Tlr2* koji nedostaje kod miške linije C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(*Tlr2-luc/gfp*)<sup>Kri/Gaj</sup>-*Tlr2*<sup>tm1Kir/Gaj</sup>. Nedostaje dio genoma koji kodira za citoplazmatsku, transmembransku i dio izvanstanične domene receptora TLR2. Promotor gena *Tlr2* ostao je očuvan, kao i dio genoma koji kodira za N-terminalni kraj proteina TLR2. Preuzeto i prilagođeno prema (128).



**Slika 8:** Shematski prikaz strategije sparenja za dobivanje nove miške linije *Tlr2*<sup>-/-</sup>(*Tlr2-luc*). Sparivani su miševi C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(*Tlr2-luc/gfp*)<sup>Kri/Gaj</sup> s linijom C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-*Tlr2*<sup>tm1-Kir/Gaj</sup>. U prvoj generaciji svi miševi su bili heterozigoti za gen *Tlr2* (*Tlr2*<sup>+/-</sup>). Odabrani su heterozigoti za transgen *Tlr2-luc/gfp* te su dalje sparivani s roditeljskom linijom koja je

*knock-out* za gen *Tlr2*: C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup> -Tlr2<sup>tm1-Kir/Gaj</sup>. U drugoj generaciji je dobivena mišja linija C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri/Gaj</sup>-Tlr2<sup>tm1 Kir/Gaj</sup> koja nema funkcionalni receptor TLR2 te je heterozigot za transgen Tlr2-luc/gfp (označeno crvenim krugom).

#### 4.2.3. Genotipizacija mišjih linija

Uzorkovanje tkiva miševa napravljeno je najprije u Nastambi za laboratorijske životinje. Prilikom odvajanja mladunaca od majke prikupljeno je tkivo vrška repa veličine do 5 mm iz kojeg se kasnije izolirala DNA. Nakon završetka *in vivo* pokusa i žrtvovanja životinje, ponovno je prikupljeno tkivo vrška repa (5 mm) kako bi se provjerili i potvrdili rezultati prvotne genotipizacije.

Tkivo vrška repa preko noći je inkubirano u 500  $\mu$ L otopine za izolaciju na temperaturi 56°C. Otopina za izolaciju imala je sljedeći sastav: 50 mM Tris baza (pH 8, Sigma Aldrich, SAD), 100 mM EDTA (etilendiamin-tetraoctena kiselina; pH 8, Kemika, Hrvatska), 1% SDS (natrijev dodecil sulfat; Sigma Aldrich, SAD) i 0.4 mg/mL proteinaze K (Promega, SAD). Sljedeći dan uzorak se centrifugirao na 10000g 20 min na sobnoj temperaturi (Centrifuga 5415 C, Eppendorf, Njemačka). Supernatant je odvojen u novu mikro epruvetu te je dodano 500  $\mu$ L izopropanola (Kemika, Hrvatska). Sadržaj je snažno protresen kako bi se istaložila DNA. Nakon toga se uzorak još jednom centrifugirao na 10000g u trajanju od 10 min. Supernatant je uklonjen, a talog se nekoliko puta isprao sterilnim 70%-tnim etanolom (Kemika, Hrvatska) nakon čega je uslijedilo centrifugiranje na 10000g 2 minute. Mikro epruveta je zatim ostavljena otvorena kako bi ispario višak etanola. Talog je na kraju resuspendiran u 200  $\mu$ L sterilne vode, izolirana DNA je dodatno prokuhana na 70°C u termobloku ThermoMixer C (Eppendorf, Njemačka) te pohranjena na 4°C.

Genotipizacija mišjih linija napravljena je metodom PCR, kojom su umnoženi segmenti genomske DNA karakteristični za pojedinu mišju liniju. Korišteno je sveukupno 3 para početnica (**Tablica 2**). Prvi par početnica umnaža dio gena *Tlr2* koji nedostaje kod Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) mišje linije korištene u ovim pokusima, dok je prisutan kod Wt(Tlr2-luc) linije. Drugi par početnica je specifičan za neomicinski alel koji je ugrađen u Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) liniji umjesto deletiranog dijela gena *Tlr2*, stoga je specifičan samo za Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) miševe. Treći par početnica umnaža dio alela za luciferazu koji je prisutan u obje mišje linije korištene u ovim pokusima.

**Tablica 2:** Karakteristike početnica korištenih za genotipizaciju mišjih linija.

Mjesto vezanja početnica	Sekvence početnica	Duljina PCR produkta
Egzon 3 gena <i>Tlr2</i> (nedostaje kod <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup> ( <i>Tlr2</i> -luc) miševa)	5' ACGAGCAAGATCAACAGGAGA 3' 5' CTCCTGAATTTGTCCAGTACA 3'	499 pb
Alel za neomicinsku rezistenciju (prisutan jedino kod <i>Tlr2</i> <sup>-/-</sup> ( <i>Tlr2</i> -luc) miševa)	5' GGGCCAGCTCATTCTCCAC 3' 5' CTCCTGAATTTGTCCAGTACA 3'	334 pb
Transgen <i>Tlr2</i> -luc-gfp (specifičnost za gen luciferaze)	5' CAGCAGGATGCTCTCCAGTTC 3' 5' GGCGCAGTAGGCAAGGTGGT 3'	300 pb

Sastav otopine za PCR bio je sljedeći: 0.125 µL GoTaq G2 polimeraza (5U/µL, Promega, SAD), 5 µL GoTaq zeleni pufer (5×, Promega, SAD), 0.5 µL smjesa dNTP-ova (Promega, SAD), 1 µL MgCl<sub>2</sub> (25mM, Promega, SAD), 11.375 µL sterilna voda, 1 µL svake početnice te 1 µL genomske DNA. Ukupni volumen smjese bio je 25 µL. Za PCR korišten je uređaj 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, SAD), a postavke uređaja za PCR su opisane u **Tablici 3**. Nakon završetka PCR reakcije uzorak je ohlađen na 4°C prije vađenja iz uređaja.

**Tablica 3:** Postavke PCR uređaja korištene prilikom genotipizacije mišjih linija.

Naziv ciklusa		Trajanje ciklusa	Temperatura	Broj ciklusa
<b>Početna denaturacija DNA</b>		2 min	95°C	1
<b>Umnažanje genomske DNA</b>	<b>Denaturacija</b>	30 s	94°C	32
	<b>Vežanje početnica</b>	30 s	63.5°C	
	<b>Ekstenzija</b>	1 min	72°C	
<b>Završna ekstenzija DNA</b>		8 min	72°C	1

Rezultati PCR reakcije vizualizirani su gel-elektroforezom. Gel za elektroforezu pripremljen je otapanjem agaroze u puferu TBE (89 mM Tris-baza, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA) u konačnoj koncentraciji od 1.5%, a dodana je i crvena boja za gel GelRed (Biotium, SAD) u koncentraciji 1/10000. Nakon polimerizacije gel je smješten u kadicu za elektroforezu te su nanoseni uzorci dobiveni PCR reakcijom (volumena 25 µL). Elektroforeza je trajala 40 min pod naponom 100V (10V/cm), a kao pufer za migraciju također je korišten pufer TBE. Uz uzorke

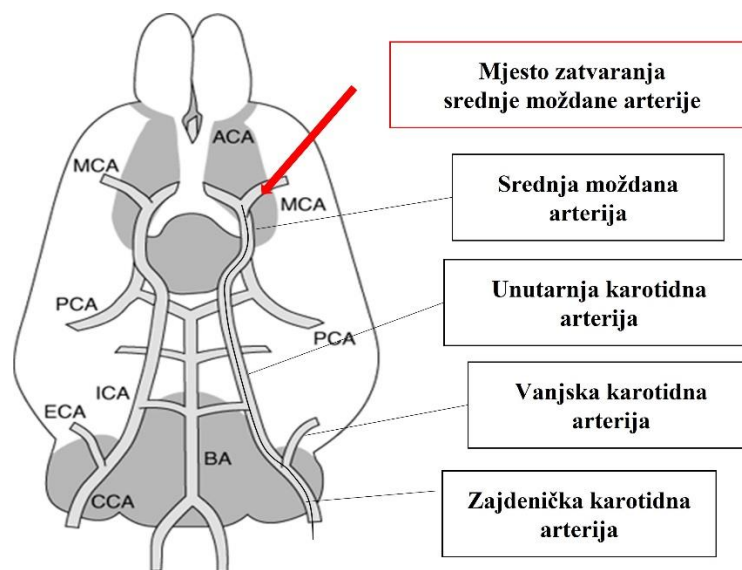


u svakoj elektroforezi nanosena je negativna kontrola koja je sadržavala sve otopine korištene za PCR osim genomske DNA, te molekularni biljeg BenchTop 100bp DNA Ladder (Promega, SAD). Gel je nakon elektroforeze izvađen iz kadice, stavljen je pod UV lampu kako bi se vizualizirali PCR produkti razdvojeni gel-elektroforezom te je fotografiran.

### 4.3. Izazivanje ishemijske lezije mišjeg mozga

#### 4.3.1. Značajke korištenog modela okluzije srednje moždane arterije

Za izazivanje ishemijske lezije mišjeg mozga korišten je model prolazne okluzije srednje moždane arterije, tMCAO (Slika 9). Ishemija je postignuta intraluminalnim umetanjem filameta u lijevu srednju moždanu arteriju u trajanju od 30 minuta, nakon čega je uslijedila reperfuzija. Okluzija je napravljena prema Koizumi metodi (99).



**Slika 9:** Shematski prikaz tMCAO modela korištenog u istraživanju. Kirurški filament (označen crnom linijom) umetnut je kroz zajedničku karotidnu arteriju kako bi zatvorio ishodište srednje moždane arterije. Preuzeto i prilagođeno prema (129).

#### 4.3.2. Opis zahvata okluzije srednje moždane arterije

Prije početka zahvata miš je izvagano te je stavljen u komoru s 3%-tnim inhalacijskim anestetikom izofluranom (Isoflurane, Abbott, UK) u 70% N<sub>2</sub>O i 30% O<sub>2</sub> s protokom od 2 L/min. Zatim je prenesen na grijanu podlogu (37°C) ispod operacijskog mikroskopa, a anestezija je održavana kroz inhalacijsku masku uz protok 1.5-2 L/min. Intraperitonealno su administrirani analgetik buprenofin (Buprenovet, Bayer, Njemačka) koncentracije 0.03 mg/kg (0.25 mL otopine) i 30% otopina glukoze u fiziološkoj otopini (0.5 mL). Kako bi se spriječilo isušivanje sluznice, oči su bile premazane oftalmičkim lubrikantom (Recugel, Bausch).

Mišu je obrijano krzno na vratu te na lubanji na mjestu lijevog temporalnog mišića pomoću aparata za brijanje te je alkoholom dezinficirana koža. Miš je najprije položen na trbuh te je postavljena laserska proba (promjera 1 mm, Moor Instruments, Millwey, Devon, UK) uz lubanju na rostralnom dijelu lijevog temporalnog režnja. Očitao se relativni protok krvi kroz srednju moždanu arteriju na perfuzijskom monitoru laserskog Dopplera (Moor Instruments, Millwey, Devon, UK). Zatim je miš položen na leđa te je cijeli MCAO zahvat odrađen pod operacijskim mikroskopom (Olympus SZ STU2, Olympus, Japan). Napravljen je rez na vratu po središnjoj liniji te su odmaknute žlijezde slinovnice i okolna vezivna tkiva kako bi se omogućio pristup zajedničkoj, vanjskoj i unutarnjoj karotidnoj arteriji. Lijeve zajedničke karotidne arterije odvojene su od okolnog tkiva, živca vagusa i jugularne vene. Prilikom zahvata se pazilo da ne dođe do oštećenja živca vagusa. Zatim su napravljena dva čvora na zajedničkoj karotidnoj arteriji korištenjem kirurškog konca (Black Braided Silk suture thread, F.S.T., SAD). Prvi čvor svezan je niže, a drugi čvor je labavo svezan što bliže račvištu vanjske i unutarnje karotidne arterije. Iznad drugog čvora postavljena je samozatvarajuća pinceta (Fine Forceps-Self-Closing Cat. #11261-30, F.S.T., SAD) kako bi se spriječio retrogradni protok krvi. Između dva čvorića na zajedničkoj karotidnoj arteriji napravljen je mali rez korištenjem škarica za mikrodisekciju (Cohan-Vannas Spring Scissors, Cat. # 15000-02, F.S.T., SAD). Kroz rez je umetnut silikonski monofilament veličine 6-0 (Docol Corporation, Sharon, MA, SAD) te je uklonjena samozatvarajuća pinceta. Monofilament je kroz zajedničku karotidnu arteriju umetnut u račvište srednje moždane arterije čime se spriječio dotok krvi. Stezanjem drugog čvora se učvrstila pozicija mikrofilamenta. Rez na vratu se zašio kirurškim koncem. Zatim se izmjerio protok krvi kroz srednju moždanu arteriju pomoću Dopplera. U slučaju uspješne operacije očekivalo se da protok krvi pade na 70-80% protoka u odnosu na mjerenje prije operacije. Zatim je miš vraćen u grijani kavez gdje je boravio idućih 30 min, tj. do kraja vremena okluzije. Nakon isteka vremena okluzije, miš je ponovno uspavan inhalacijskom anestezijom (izofluranom) te je izmjeren protok krvi kroz lijevu srednju moždanu arteriju prije vađenja filameta kako bi potvrdili da se protok krvi nije povećao tijekom trajanja okluzije (tj. da nije došlo do pomicanja filameta i preuranjene reperfuzije). Zatim je izvađen monofilament kako bi se uspostavila reperfuzija. Rana na vratu zašivena je kirurškim koncem te je Dopplerom ponovno izmjeren protok krvi kroz lijevu srednju moždanu arteriju kako bi se potvrdila uspješnost reperfuzije. Miš je zatim vraćen u kavez.

Lažne (sham) operacije napravljene su na isti način kao i tMCAO. Nakon što je miš uspavan i pripremljen za operaciju, napravljena su dva čvora na lijevoj zajedničkoj karotidnoj arteriji, na

istoj poziciji kao i za tMCAO zahvat. Između čvorova napravljen je mali rez pomoću škarica za mikrodisekciju kroz koji je umetnut silikonski monofilament (6-0, Doccol Corporation) u zajedničku karotidnu arteriju te posljedično u srednju moždanu arteriju. Međutim, razlika u odnosu na tMCAO zahvat bila je u tome što kod lažnih operacija nije bilo perioda okluzije, nego je vađenje filameta uslijedilo neposredno nakon umetanja u srednju moždanu arteriju. Protok krvi kroz srednju moždanu arteriju mjereno je pomoću laserskog Dopplera prije i nakon lažne operacije, a zahvat se smatrao uspješnim ako nije došlo do značajnog pada protoka krvi nakon operacije, u odnosu na početne vrijednosti (<10%).

#### **4.3.3. Postoperativna njega životinja**

Nakon tMCAO ili sham zahvata kavez s miševima ostavljen je 24 h na grijanoj podlozi (na 37°C). Također, hrana i voda su stavljene na dno kaveza te su briketi omekšani namakanjem u vodi. Uz briquete, miševima je nakon operacije davana i hrana za dojenčad. Kako bi se ublažila post-operativna bol miševima se tijekom dva dana nakon operacije davao analgetik buprenofin (0.05 mg/kg, 0.25 mL, intraperitonealna injekcija jednom dnevno) te 30% otopina glukoze u fiziološkoj (0.25 mL intraperitonealnom injekcijom jednom dnevno) kako bi se spriječila dehidracija i nagli gubitak tjelesne mase.

#### 4.4. Procjena neurološkog deficita

Neurološki deficit procijenjen je svim životinjama koje su prošle tMCAO zahvat i to u vremenskim točkama prije tMCAO, te na dane 2, 4 i 7 nakon tMCAO. Uz neurološki deficit se u istim vremenskim točkama mjerila i tjelesna masa životinja. Tjelesna masa životinja prikazana je kao udio izgubljene mase u odnosu na vrijednost prije tMCAO zahvata. Bodovna skala neurološkog deficita kretala se 0-39, gdje 0 označava životinje bez neurološkog deficita dok je 39 maksimalni neurološki deficit koji je moguće izmjeriti ovim protokolom. Korišten je modificirani protokol za procjenu neurološkog deficita koji se sastojao od nekoliko procjenskih kategorija (130) (131). Najprije se ocjenjivao izgled životinje koji obuhvaća izgled dlake (0-2 boda), uški (0-2 boda), oka (0-4 boda) i položaj tijela životinje (0-4 boda). Zatim se boduje mobilnost i spontana aktivnost životinje (0-5 bodova), nepravilnosti u kretanju (0-5 bodova), zakretanje trupa (0-2 boda), savijanje šapa (0-2 boda), otpor prema podražaju na lateralnoj strani trupa (0-2 boda za svaku stranu tijela) te polaganje ipsilateralne (0-2 boda) i kontralateralne (0-2 boda) prednje šape. Na kraju se testiraju refleksi, uključujući refleks na nagli zvučni podražaj (0-1 bod), refleks podražaja brkova (0-1 bod za svaku stranu tijela), podražaj uški (0-1 bod za svaku stranu) i podražaj prednjih šapa (0-1 bod za svaku stranu). Detaljniji opis bodovnih kategorija nalazi se u **Tablici 4**. Iz apsolutnih vrijednosti neurološkog deficita izračunat je postotak smanjenja neurološkog oštećenja. Ovaj parametar je dobiven dijeljenjem vrijednosti neurološkog deficita na dan 4 ili 7 s deficitom izmjerenim 2 dana nakon tMCAO kada je zabilježen najveći neurološki deficit.

Miševi su tjedan dana prije tMCAO prebačeni iz nastambe za životinje u prostorije Laboratorija za Regenerativnu Neuroznanost kako bi se priviknuli na novo okruženje i na ispitivača. Ispitivač je cijelo vrijeme nosio zaštitnu odjeću s maskom, kapom i rukavicama. Prije početka procjene neurološkog deficita komora korištena za ispitivanje je prebrisana alkoholom, a miševi su dodirivani isključivo sterilnim vatenim štapićem. Prilikom procjene neurološkog deficita miš je prebačen u zasebnu komoru te se prvih par minuta privikavao na novo okruženje. Neurološki deficit procijenjen je prije izvođenja bilo koje druge intervencije koja je bila zakazana za tu vremensku točku kako bi se uklonio njihov potencijalni utjecaj na ponašanje miševa.

**Tablica 4:** Detaljni opis bodovnih kategorija za protokol procjene neurološkog deficita.

Kategorija		Opis bodovnih kategorija
<b>Izgleđ</b>	<b>Dlaka</b>	<p><b>0 bodova</b> – Glatka, uredna</p> <p><b>1 bod</b> – Lokalizirana piloerekcija</p> <p><b>2 boda</b> – Neuredna, piloerekcija po cijelom trupu</p>
	<b>Uši</b>	<p><b>0 bodova</b> – Uspravne i simetrične</p> <p><b>1 bod</b> – Položene lateralno, asimetrične</p> <p><b>2 boda</b> – Nagnute unazad, asimetrične</p>
	<b>Oči</b>	<p><b>0 bodova</b> – Bistre i širom otvorene</p> <p><b>1 bod</b> – Djelomično zatvorene</p> <p><b>2 boda</b> – Djelomično zatvorene i prekrivene vodenom sluzi</p> <p><b>3 boda</b> – Djelomično zatvorene i prekrivene tamnom sluzi</p> <p><b>4 boda</b> – Potpuno zatvorene</p>
	<b>Položaj tijela</b>	<p><b>0 bodova</b> – Ravna postura</p> <p><b>1 bod</b> – Lagana pogrbljenost</p> <p><b>2 boda</b> – Umjerena pogrbljenost</p> <p><b>3 boda</b> – Izražena pogrbljenost</p> <p><b>4 boda</b> – Potpuna pogrbljenost</p>
<b>Mobilnost i spontana aktivnost</b>		<p><b>0 bodova</b> – Normalna pokretljivost i spontana aktivnost</p> <p><b>1 bod</b> – Blago smanjena spontana aktivnost</p> <p><b>2 boda</b> – Pomicanje udova bez aktivnog pokretanja</p> <p><b>3 boda</b> – Kretanje isključivo nakon podražaja</p> <p><b>4 boda</b> – Izostanak kretanja nakon podražaja, normalni mišićni tonus</p> <p><b>5 bodova</b> – Potpuni gubitak mišićnog tonusa, premortalni znakovi</p>
<b>Nepравilnosti u kretanju</b>		<p><b>0 bodova</b> – Ravno hodanje</p> <p><b>1 bod</b> – Hodanje prema kontralateralnoj strani</p> <p><b>2 boda</b> – Naizmjenično ravno hodanje i hodanje u krug</p> <p><b>3 boda</b> – Naizmjenično hodanje na kontra stranu i hodanje u krug</p> <p><b>4 boda</b> – Hodanje u krug uz dodatne poremećaje u hodu</p> <p><b>5 bodova</b> – Neprestano kruženje na kontra stranu tijela</p>

<b>Zakretanje trupa</b>		<b>0 bodova</b> – Zakretanje na obje strane <b>1 bod</b> – Zakretanje samo na jednu stranu <b>2 boda</b> – Nemogućnost zakretanja trupa	
<b>Savijanje šapa</b>		<b>0 bodova</b> – Normalno savijanje obje šape <b>1 bod</b> – Nemogućnost savijanja jedne šape <b>2 boda</b> – Nemogućnost savijanja obje šape	
<b>Otpor na bočni pritisak</b>		<b>0 bodova</b> – Jaki otpor na obje strane tijela <b>1 bod</b> – Otpor samo na jednoj strani tijela <b>2 boda</b> – Nema otpora	
<b>Polaganje šapa</b>	<b>Ipsi</b>	<b>0 bodova</b> – Oslanjanje na podlogu punom prednjom šapom <b>1 bod</b> – Blago oslanjanje na podlogu, samo prstima prednje šape <b>2 boda</b> – Nema oslanjanja prednje šape na podlogu	
	<b>Kontra</b>	<b>0 bodova</b> – Oslanjanje na podlogu punom prednjom šapom <b>1 bod</b> – Blago oslanjanje na podlogu, samo prstima prednje šape <b>2 boda</b> – Nema oslanjanja prednje šape na podlogu	
<b>Refleksi</b>	<b>Zvučni podražaj</b>		<b>0 bodova</b> – Životinja se trzne <b>1 bod</b> – Odsustvo reakcije
	<b>Brkovi</b>	<b>Ipsi</b>	<b>0 bodova</b> – Odmicanje glave <b>1 bod</b> – Odsustvo reakcije
		<b>Kontra</b>	<b>0 bodova</b> – Odmicanje glave <b>1 bod</b> – Odsustvo reakcije
	<b>Uške</b>	<b>Ipsi</b>	<b>0 bodova</b> – Odmicanje glave <b>1 bod</b> – Odsustvo reakcije
		<b>Kontra</b>	<b>0 bodova</b> – Odmicanje glave <b>1 bod</b> – Odsustvo reakcije
	<b>Prednje šape</b>	<b>Ipsi</b>	<b>0 bodova</b> – Odmicanje šape <b>1 bod</b> – Odsustvo reakcije
		<b>Kontra</b>	<b>0 bodova</b> – Odmicanje šape <b>1 bod</b> – Odsustvo reakcije

#### 4.5. Snimanje mišjeg mozga magnetskom rezonancijom

Kako bi se longitudinalno pratio volumen ishemijske lezije, miševi su bili podvrgnuti snimanju magnetskom rezonancijom. Magnetska rezonancija mišjeg mozga snimana je prije tMCAO, te 2, 4 i 7 dana nakon izazivanja ishemijske lezije. Korišten je uređaj Bruker BioSpec 70/20 USR (Bruker, Biospin, Njemačka) snage magnetskog polja 7 T u Tx/Rx konfiguraciji s volumnom zavojnicom promjera 86 mm (MT0381, Bruker Biospin Njemačka) za odašiljanje signala (Tx) i dvoelementnom površinskom zavojnicom za mišji mozak (MT0042, Bruker Biospin, Njemačka) za primanje signala (Rx). Snimljene su T2-ponderirane snimke i T2 mapa za svaku vremensku točku.

##### 4.5.1. Protokol za *in vivo* snimanje magnetske rezonancije mišjeg mozga

Miševi su anestetizirani u grijanoj indukcijskoj komori pomoću 1.5% izoflurana u mješavini plinova 70%/30% N<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> te je anestezija održavana tijekom cijelog trajanja snimanja. Nakon uspavlivanja miš je prenesen u uređaj za magnetsku rezonanciju. Postavljen je na trbuh, a na njušku mu je stavljena maska za inhalacijsku anesteziju. Glava miša učvršćena je pomoću plastičnih štapića koji su postavljeni na kosti lubanje, unutar uške neposredno iznad vanjskog zvukovoda, te pomoću staklenog štapića kojeg je miš zagrizao prednjim zubima. Oči su zaštićene korištenjem oftalmičkog lubrikanta kako bi se spriječilo isušivanje. Također, postavljen je senzor za disanje i rektalna sonda za praćenje tjelesne temperature. Podloga u MRI uređaju bila je grijana te je miš dodatno pokriven polukružnim plastičnim grijačem kako ne bi došlo do hipotermije tijekom snimanja. Cijeli sustav grijača bio je povezan na sustav cirkulacije tople vode, a temperatura je regulirana mehanizmom povratne sprege pomoću očitavanja tjelesne temperature rektalnom sondom. Tijekom cijelog trajanja snimanja pratilo se disanje životinje te je sukladno prilagođena količina inhalacijske anestezije. Temperatura tijela održavana je u rasponu od 36.5 - 37°C, a disanje u rasponu od 80 – 100 udisaja po minuti. Dvoelementna zavojnica položena je iznad glave miša pazeći da ne pritišće lubanju. Za upravljanje sekvencama tijekom snimanja korišten je program Bruker Paravision 6.1.1. (Bruker, Biospin, Njemačka). Protokol snimanja sastojao se od pripreme i glavnih snimaka (**Tablica 5**), a snimanje je trajalo sveukupno 30 minuta. Pripremne snimke su bile pilot snimke niske razlučivosti (Localizer\_multi\_slice i Localizer\_Sagital). Glavne snimke su obuhvaćale Turbo Spin-Echo sekvencu s visokom razlučivošću (T2w\_cor\_brain) i Multi-echo Spin-Echo snimku sekvencijskog protokola (T2map\_cor\_Brain) iz koje je pomoću makro naredbi programa Paravision izračunata T2 mapa.



**Tablica 5:** Parametri snimanja pojedinih sekvenci na magnetskoj rezonanciji.

	Localizer_multi _slice	Localizer_Sagital	T2w_cor_ Brain	T2map_cor _Brain
Vrijeme odjeka	4 ms	4 ms	33 ms	7.5 ms
Vrijeme ponavljanja	15 ms	15 ms	3000 ms	3150 ms
Razmak odjeka	/	/	8.25 ms	7.5 ms
Broj usrednjavanja	1	1	8	3
Orijentacija slike	Koronarna, sagitalna i aksijalna	Sagitalna	Koronarna	Koronarna
Broj slika	3 × 5	3	25	25
Debljina slike	0.8 mm	0.8 mm	0.4 mm	0.4 mm
Rezolucija	0.133×0.133 mm	0.133×0.133 mm	0.100×0.100 mm	0.125×0.125 mm

#### 4.5.2. Volumetrijska analiza MRI snimaka mišjeg mozga

MRI snimke bile su spremljene u formatu DICOM te su prije obrade prebačene u format NIfTI, pomoću programa Bru2Nii (132). Tako dobivene snimke analizirane su u programu ImageJ (NIH, Bethesda, SAD). Kontralateralna i ipsilateralna hemisfera mozga ocrtavane su na snimkama tipa T2 u području koje odgovara velikom mozgu prema anatomskom atlasu mišjeg mozga. Na T2 mapi određen je volumen ishemijske lezije ocrtavanjem hiperintenzivnog signala koji je posljedica nakupljanja vode tijekom nastanka vazogenog edema. Sve mjerene strukture manualno su ocrtane te im je izračunat volumen. Ishemijska lezija prikazana je kao apsolutni volumen (u mm<sup>3</sup>) te kao postotak volumena ipsilateralne hemisfere koji je prekriven hiperintenzivnim signalom na T2 mapi. Uz volumen ishemijske lezije na T2 mapama izračunato je i srednje vrijeme T2 relaksacije u području ishemijske lezije, tj. intenzitet edema. Intenzitet edema određen je težinskim zbrajanjem intenziteta piksela na svakom pojedinom presjeku mozga te je tako dobiveni parametar predstavljao posrednu mjeru jačine edema, tj. indirektnu mjeru količine vode u tkivu mozga koja se nakuplja uslijed razvoja edema. Nadalje, izračunat je indeks edema (**Formula 1**) i volumen ishemijske lezije je korigirana za edem (**Formula 2**) prema već opisanim formulama napravljenim specifično za volumetrijske analize ishemijske lezije pomoću magnetske rezonancije (133).

$$\text{Indeks edema (\%)} = \frac{V(\text{kontra}) + V(\text{ipsi})}{2 * V(\text{kontra})} * 100$$

**Formula 1:** Formula za računanje indeksa edema nakon ishemijske lezije. V(kontra/ipsi) – volumen kontralateralne/ipsilateralne hemisfere mozga (izražen u mm<sup>3</sup>) dobiven ocrtavanjem hemisfera na T2-ponderiranim snimkama. Preuzeto iz (133).

$$\text{Ishemijska lezija korigirana na edem (\%)} = \frac{V(\text{kontra}) - V(\text{ipsi}) + V(\text{lezija})}{V(\text{kontra})} * 100$$

**Formula 2:** Formula za računanje postotka ipsilateralne hemisfere prekrivenog ishemijskom lezijom korigiranom za vazogeni edem. V(kontra/ipsi) – volumen kontralateralne/ipsilateralne hemisfere mozga (izražen u mm<sup>3</sup>) dobiven ocrtavanjem hemisfera na T2-ponderiranim snimkama; V(lezija) – volumen lezije bez korekcije na edem (volumen dobiven ocrtavanjem hiperintenzivnog signala na T2 mapi, izražen u mm<sup>3</sup>). Preuzeto iz (133).

#### 4.6. Snimanje mišjeg mozga metodom *in vivo* bioluminiscencije

Metodom *in vivo* bioluminiscencije longitudinalno je praćen izražaj promotora gena *Tlr2* u mozgu nakon ishemijske lezije kod miševa. Miševi su snimani *in vivo* bioluminiscencijom prije tMCAO te 2, 4 i 7 dana nakon izazivanja ishemijske lezije.

##### 4.6.1. Protokol snimanja *in vivo* bioluminiscencije

Snimanje bioluminiscencije provedeno je uređajem IVIS<sup>®</sup> Spectrum (Caliper Life Sciences, PerkinElmer company, SAD) u programu LivingImage<sup>®</sup> (verzija 4.7.3, PerkinElmer, SAD). Kao supstrat za luciferazu korišten je D-luciferin (IVISbrite D-Luciferin Potassium Salt Bioluminescent Substrate, PerkinElmer, SAD) koji pomoću luciferaze u tijelu miša oksidira u okso-luciferin uz otpuštanje fotona. S obzirom da je u mišjim modelima korištenim u ovim pokusima luciferaza izražena pod kontrolom promotora gena *Tlr2*, bioluminiscencije je bila prisutna samo u stanicama s aktivnim promotorom gena *Tlr2*. Otopina D-luciferina pripravljena je otapanjem soli u fiziološkoj otopini u konačnoj koncentraciji od 15 mg/mL. Miševima je davano 150 mg/kg luciferina i u volumenu od 10 µL/g, sukladno uputama proizvođača.

Miševi su najprije prebačeni u indukcijsku komoru gdje su anestetizirani inhalacijskom anestezijom pomoću 2% izoflurana u 100% kisiku te je ista anestezija održavana tijekom cijelog trajanja snimanja. Zatim su prebačeni u IVIS Spectrum, gdje su položeni na grijanu podlogu (37°C) u potrbušnom položaju tako da im je na njušku stavljen stakleni nastavak koji dovodi inhalacijsku anesteziju. Najprije je snimana takozvana *blank* sekvenca gdje miševima nije ubrizgan bioluminiscentni supstrat. Ova sekvenca sastojala se od dvije snimke kojima je vrijeme ekspozicije bilo 2 minute, na vidnom polju E (veličine 25.2 x 25.2 cm), srednjeg stupnja zaprimanja informacija o rezoluciji (engl. *medium binning*) i uz aperturu leće f/1. Nakon toga miševima je intraperitonealnom injekcijom (veličina igle bila je 27 G) ubrizgana otopina D-luciferina. Miševi su prilikom davanja injekcije bili anestetizirani te su vraćeni u IVIS neposredno nakon injekcije, prije nego što je anestezija popustila. Zatim je sniman bioluminiscentni signal tijekom 55 min. Korištena je sekvenca s 29 snimki uz automatsko vrijeme ekspozicije, na vidnom polju E, srednjeg stupnja zaprimanja informacija o rezoluciji (engl. *medium binning*) i uz aperturu leće f/1. Ukupno vrijeme potrebno za uspostavljanje anestezije i snimanje bioluminiscencije korištenjem obje sekvence bilo je 1h i 10 min.

#### 4.6.2. Kvantifikacija intenziteta bioluminiscentnog signala

Tijekom snimanja bioluminiscencije stvaraju se pseudo-obojene slike gustoće fotona supraponirane na crno-bijelu fotografiju snimljenu na početku snimanja. Pseudo-obojene slike sadrže spektar boja od plave do crvene gdje plava i zelena predstavljaju najniže vrijednosti bioluminiscencije, dok žuta i crvena predstavljaju najviše vrijednosti. Kvantifikacija bioluminiscencije napravljena je u programu LivingImage<sup>®</sup> (PerkinElmer, SAD). Emitirana bioluminiscencija mjerena je i kvantificirana pomoću emisije fotona u jedinici vremena (foton/s, ukupan broj fotona po sekundi) te u jedinicama površinskog zračenja (foton/s/cm<sup>2</sup>/sr, foton po sekundi u površina regije od interesa i kutu steradijana). Regije od interesa postavljene su iznad glave miševa. Korištene su dvije veličine regija od interesa. Za mjerenje bioluminiscencije u cijelom mozgu korištena je regija od interesa kvadratnog oblika dimenzija 3.6 × 3.6 cm, a za mjerenje bioluminiscencije u pojedinim hemisferama mozga korištena je regija pravokutnog oblika dimenzija 1.3 × 2.6 cm. Bioluminiscencija za svaku pojedinačnu snimku snimljenu nakon injekcije D-luciferina normaliziran je na vrijednosti *blank* sekvence snimljene prije injekcije D-luciferina čime se uklonio nespecifični pozadinski šum. Dobivene su krivulje intenziteta bioluminiscentnog signala u ovisnosti o vremenu nakon injekcije D-luciferina. Kvantifikacija je provedena računajući ukupnu površinu ispod krivulje, tj. ukupni protok fotona (engl. *total flux/radiance*). Iz apsolutnih vrijednosti bioluminiscencije izračunat je postotak smanjenja bioluminiscencije stupnjevanjem vrijednosti izmjerenih na dan 4 ili 7 u odnosu na početne vrijednosti prije operacije te na vrijednosti dobivene 2 dana nakon tMCAO kada je zabilježen najveći signal (**Formula 3**).

$$\text{Postotak smanjenja BLI (\%)} = \frac{\text{BLI (dan 4 ili 7)} - \text{BLI (BL)}}{\text{BLI (dan 2)} - \text{BLI (BL)}} * 100$$

**Formula 3:** Formula za računanje postotka smanjenja bioluminiscencije, prema kojoj je bioluminiscencija prije tMCAO (BLI(BL)) definirana kao 0%, dok je maksimalna bioluminiscencija izmjerena 2 dana nakon tMCAO (BLI(dan 2)) definirana kao 100%. Postotak smanjenja bioluminiscencije na dane 4 ili 7 nakon tMCAO (BLI(dan 4 ili 7)) izračunat je stupnjevanjem prema početnim vrijednostima bioluminiscencije (BLI(BL)) te prema maksimalnoj bioluminiscenciji 2 dana nakon tMCAO (BLI(dan 2)).

#### **4.7. Određivanje upalnih biljega u mišjem mozgu metodom protočne citometrije**

Za potrebe protočne citometrije miševi su žrtvovani u 3 vremenske točke: prije tMCAO, te 4 i 8 dana nakon ishemije. Protočna citometrija napravljena je na izoliranim mišjim mozgovima, a cilj je bio odrediti količinu upalnih stanica (mikroglia, makrofagi, limfociti) te dodatnih biljega upale (CD68 i TLR2) nakon moždanog udara. Mišji mozgovi razdijeljeni su na hemisfere te su na protočnom citometru svi uzorci bili propuštani zasebno.

##### **4.7.1. Izolacija mišjeg mozga za potrebe protočne citometrije**

Neposredno prije žrtvovanja, mišu je intraperitonealnom injekcijom administriran 2.5%-tni tribrometanol (Avertin, Sigma Aldrich, SAD) u dozi 250 mg/kg. Žrtvovanje miša započelo je tek nakon potvrde odsutnosti refleksa prilikom pritiska na šapu. Miš je položen na leđa te je kirurškim škarcama napravljen rez počevši od donjeg dijela abdomena sve do prsnog koša. Na prsnom košu napravljena su dva reza, po jedan na obje bočne strane kako se ne bi oštetile velike krvne žile na sredini prsnog koša. Prerezan je i ošit, a ventralni dio prsnog koša odmaknut je uz pomoć hvataljki kako bi se omogućio pristup srcu. U lijevu klijetku stavljena je 25 G intravenozna kanila (KD-Fly, KDM, Poljska) koja je bila spojena na špricu s 20 mL fosfatnog pufera (pH 7.4, PBS, fosfatni pufer, engl. *phosphate buffered saline*, sastava 13.7 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.65 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; Kemika, Hrvatska) sobne temperature. Zatim je prerezana desna pretklijetka te se polako i postepeno ispuštao PBS iz šprice kako bi se uklonila sva krv. Uspješnost perfuzije pratila se pomoću gubitka boje srca, jetre i pluća. Nakon toga miš je dekapitiran te je uklonjen skalp kako bi se omogućio pristup lubanji. Kostii lubanje pažljivo su odstranjene kirurškim škarcama te je izvađen mozak. Mozak je najprije ispran u PBS-u, hemisfere mozga su razdvojene po središnjem sulkusu, a zatim su svaka zasebno prebačene u petrijevke s 2 mL HBSS pufera (Hanksova balansirana otopina soli, engl. *Hanks' Balanced Salt Solution*, Capricorn Scientific, Njemačka) temperature 4°C.

##### **4.7.2. Priprema stanica za protočnu citometriju**

Odvojene hemisfere mišjeg mozga najprije su usitnjene kirurškim skalpelom. Zatim je uslijedila enzimska digestija tkiva pomoću akutaze (StemPro™ Accutase™ Cell Dissociation Reagent, Gibco, SAD). Dodano je 2 mL akutaze na usitnjene hemisfere mozga te je smjesa inkubirana 20 min u vodenoj kupelji na 37°C. Nakon inkubacije digestijski enzimi su

neutralizirani dodavanjem 4 mL DMEM-a (Dulbeccov modificirani medij, engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Gibco, SAD). Sadržaj se centrifugirao 5 min na 250 g (centrifuga Universal 320R, Hettich, Njemačka) i na temperaturi 4°C. Uklonjen je supernatant, a talog se isprao s 2 mL HBSS-a nakon čega je ponovljeno centrifugiranje. Ponovno je uklonjen supernatant, a talog se resuspendirao u 2 mL HBSS-a te je protisnut kroz stanično sito s veličinom pora 70 µm (Corning Falcon, USA). Uslijedilo je postupak uklanjanja mijelina korištenjem Percolla (Sigma Aldrich, SAD). Percollu je dodan 10× HBSS (Gibco, SAD) tako da je nakon miješanja tekućina koncentracija HBSS-a bila 1×. Zatim su napravljene 3 koncentracije Percolla dodavanjem 1× HBSS pufera: 30%, 37% i 70% (134, 135). Izolirane stanice resuspendirane su u 4 mL izotonične 37%-tne otopine Percolla te su prebačene u Falcon tubu od 15 mL (Falcon, USA). Ispod suspenzije stanica u Percollu pažljivo je dodano 4 mL otopine 70%-tnog Percolla, a iznad je dodano 4 mL 30%-tne otopine Percolla. Na kraju je na vrh Falcon tube dodano 2 mL HBSS-a. Uslijedilo je centrifugiranje u trajanju od 40 min na 300 g i temperaturi 18°C. Postavke ubrzavanja centrifuge su namještene na minimalnu vrijednost, a kočnica je u potpunosti isključena kako ne bi došlo do disrupcije koncentracijskih gradijenata Percolla. Nakon centrifugiranja stanice su bile istaložene na granici između 37% i 70%-tnog Percoll gradijenta, a mijelin se nalazio neposredno ispod sloja HBSS-a. Stanice su sakupljene i prebačene u novu Falcon tubu. Zatim su dva puta isprane s 6 mL HBSS-a i centrifugirane na 250 g, 5 min na temperaturi 4°C.

#### **4.7.3. Obilježavanje stanica protutijelima konjugiranim fluorescentnom bojom**

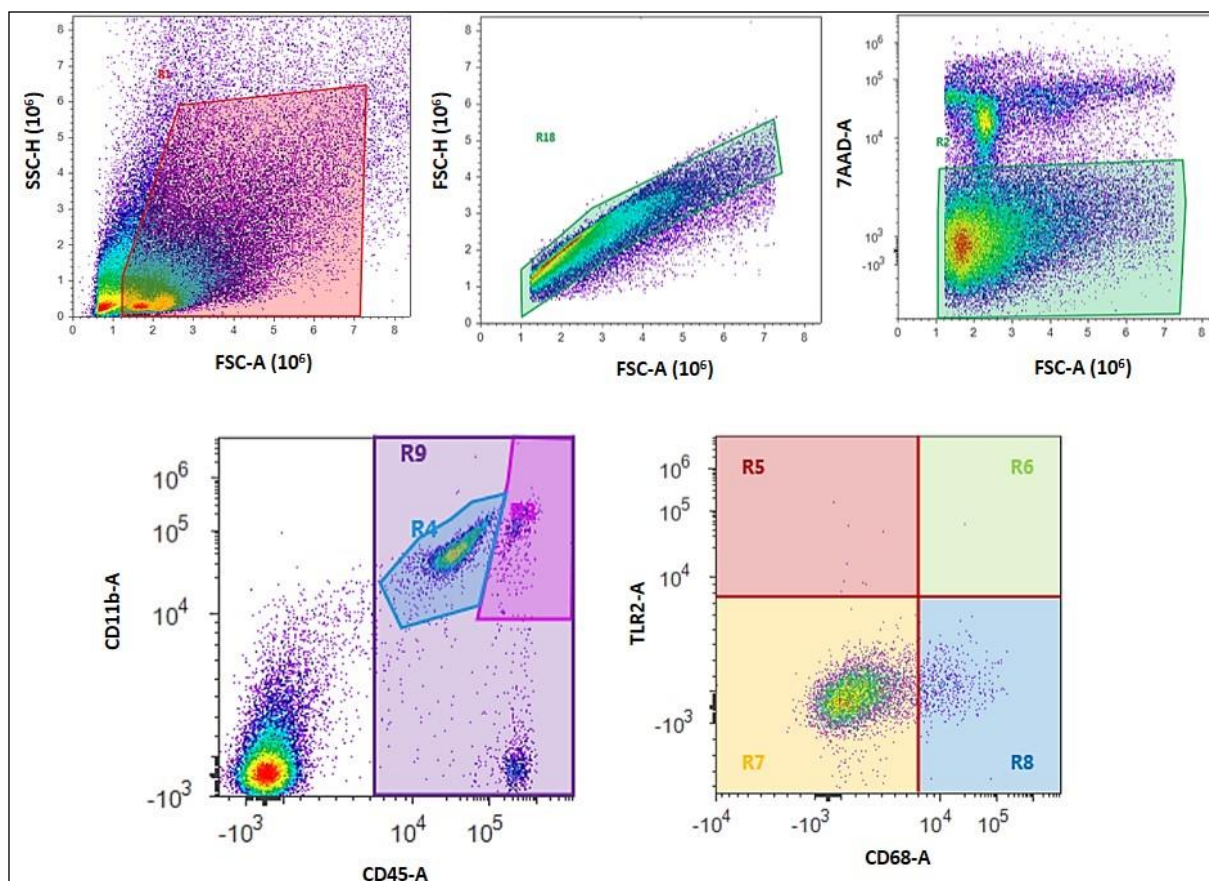
Antitijela za protočnu citometriju otopljeni su u otopini 2% FBS-a (serum fetalnog goveda, engl. *fetal bovine serum*; Gibco, USA) u PBS-u, a razrjeđenja su navedena u **Tablici 6**. Nakon ispiranja stanicama je uklonjen supernatant tako da na dnu Falcon tube ostane 40 µL HBSS-a u koji je još dodano 10 µL otopine s antitijelima te su stanice resuspendirane. Uslijedila je inkubacija 30 min na ledu, a uzorci su bili zaštićeni od svjetla aluminijskom folijom. Nakon isteka vremena inkubacije dodano je 2 mL otopine 2%-tnog FBS-a u PBS-u kako bi se uklonila sva nespecifično vezana antitijela. Uzorci su centrifugirani 5 min na 250 g i temperaturi 4°C. Nakon uklanjanja supernatanta talog je otopljen u 400 µL 2%-tnog FBS-a u PBS-u te je dodana boja za raspoznavanje mrtvih i živih stanica (7AAD, 7-animo-aktinomicin D; BioLegend, SAD) u konačnoj koncentraciji 0.25 µg/mL.

**Tablica 6:** Popis i karakteristike antitijela korištenih za pokuse protočne citometrije.

Antitijelo	Podrijetlo	Fluorescentna boja konjugirana na antitijelo	Razrjeđenje	Proizvođač	Kataloški broj
CD45	štakor	APC (alofikocijanin)	1:200	BioLegend	B289585
CD11b	štakor	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	1:200	BioLegend	B254608
TLR2	štakor	PE (fikoeritrin)	1:200	BioLegend	B280365
CD68	štakor	APC-Cy7 (APC-Cijanin 7)	1:100	BioLegend	B278449

#### 4.7.4. Postavke protočne citometrije i strategija razvrstavanja stanica

Protočna citometrija napravljena je na uređaju Attune<sup>®</sup> Acoustic Focusing Cytometer (Thermo Fischer Scientific, SAD) s ekscitacijskim laserima valnih duljina 488 nm i 638 nm. Korišteni su sabirni filteri za valne duljine:  $530 \pm 30$  nm (za anti CD11b-Alexa Fluor<sup>®</sup> 488),  $574 \pm 26$  nm (za anti TLR2-PE),  $690 \pm 50$  nm (za anti 7-AAD),  $660 \pm 20$  nm (za anti CD45-APC) i  $780 \pm 60$  nm (za anti CD68-APC-Cy7). Stanice su najprije sortirane korištenjem direktnog (FSC, engl. *forward scatter*) i postraničnog raspršenja (SSC, engl. *side scatter*). Zatim su odvojene pojedinačne stanice korištenjem grafikona površine i visine direktnog raspršenja. Za daljnju analizu korištene su isključivo žive stanice koje su bile negativne na 7-AAD boju. Korištenjem grafikona CD45/CD11b odvojene su stanice mirujuće mikroglije (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>srednji</sup>), aktivirane mikroglije i makrofaga (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>visoki</sup>) te limfociti (CD11b<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>). Na kraju je na stanicama mikroglije (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>srednji</sup> i CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>visoki</sup>) gledan izražaj upalnih biljega CD68 i TLR2 (**Slika 10**). Analiza rezultata provedena je u programu Attune NxT Software v. 2.5 (Thermo Fischer Scientific, SAD).



**Slika 10:** Strategija razvrstavanja stanica na protočnom citometru. Stanice su najprije razdvojene na grafikonu direktnog i postraničnog raspršenja. Uslijedilo je uklanjanje nakupina stanica na grafikonu površine i visine direktnog raspršenja. Zatim su odvojene isključivo žive stanice koje su bile negativne za 7AAD boju. Žive stanice su zatim analizirane na izražaj CD45 i CD11b. Aktivirana mikroglia i makrofagi bili su definirani kao populacija  $CD11b^+CD45^{visoki}$ , dok je mirujuća mikroglia bila definirana kao  $CD11b^+CD45^{srednji}$ . Dodatno, populacija  $CD11b^-CD45^+$  predstavljala je limfocite, a ostale stanice središnjeg živčanog sustava (astrociti, neuroni, oligodendrociti i endotelne stanice) su pripadala populaciji  $CD11b^-CD45^-$ . Na kraju je na sveukupnim stanicama mikroglije ( $CD11b^+CD45^{srednji}$  i  $CD11b^+CD45^{visoki}$ ) određen izražaj receptora CD68 i TLR2.



## **4.8. Histološka analiza mišjeg mozga**

Histološka analiza mišjeg mozga napravljena je metodom imunohistokemije korištenjem sekundarnih antitijela obilježenih fluorescentnom bojom. Za potrebe imunohistokemije miševi su žrtvovani 4 i 8 dana nakon tMCAO.

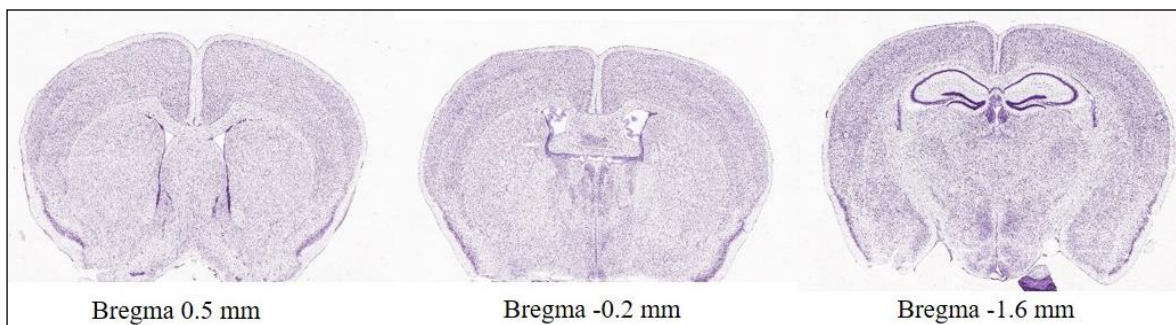
### **4.8.1. Perfuzija i izolacija mišjeg mozga za potrebe histološke analize**

Perfuzija mišjeg mozga za potrebe histološke analize slična je kao i perfuzija za protočnu citometriju, opisana u prethodnom poglavlju. Razlika je u tome što se nakon perfuzije otopinom PBS-a u lijevu klijetku miša stavila kanila spojena na špricu napunjenu s 20 mL otopine 4% paraformaldehida (PFA; Biognost, Hrvatska) kako bi se djelomično fiksiralo tkivo miša prije izolacije mozga. Uslijedila je izolacija mozga, a mozak je stavljen u 4% PFA otopinu i pohranjen na 4°C.

### **4.8.2. Postfiksacija i krioprotekcija mišjeg mozga**

Izolirani mišji mozgovi su preko noći stajali u otopini 4% PFA. Zatim su isprani u PBS-u 3 puta u trajanju od 30 min. Nakon toga su prolazili kroz gradijent saharoze. Najprije su stavljeni u 10%-tnu otopinu saharoze (Sigma-Aldrich, SAD) u PBS-u i inkubirani preko noći. Isti postupak je ponovljen s 20%-tnom otopinom te na kraju s 30%-tnom otopinom saharoze u PBS-u. Uslijedilo je uklapanje mozgova u krioprezervacijski medij TissueTek (O.C.T. Compound, Sakura, SAD) i pohrana na -20°C kako bi se formirao tvrdi blok.

Mišji mozgovi rezani su na kriostatu Leica, model CM3050 S (Leica, Njemačka). Montirani su na nosač unutar kriostata u frontalnoj (koronarnoj) orijentaciji tako da su bulbusi bili okrenuti prema naprijed, tj. prema oštrici kriostata. Temperatura unutar kriostata prilikom rezanja mozgova bila je -20°C. Sakupljeni su rezovi debljine 30 µm, po tri reza na preparatu frontalne orijentacije, a korištene su pozitivno nabijene predmetnice Superfrost Plus (Adhesion Microscope Slides, Epremedia, SAD). Sakupljene su sljedeće regije ovisno o udaljenosti od bregme: 0.5 mm, -0.2 mm i -1.6 mm (**Slika 11**), jer su to područja irigacije srednje moždane arterije. Za svaki mozak sakupljeno je 10 preparata koji su bili pohranjeni na -20°C.



**Slika 11:** Prikaz rezova koji su sakupljeni prilikom rezanja na kriostatu i kasnije korišteni za imunohistokemijsko bojenje. Regije mozga odabrane su prema udaljenosti od bregme: 0.5 mm, -0.2 mm i -1.6 mm. Preuzeto i prilagođeno iz (136).

#### 4.8.3. Protokol za imunohistokemijsko bojenje prereza mišjeg mozga

Prije postupka imunohistokemije preparati mišjeg mozga su preko noći ostavljeni na sobnoj temperaturi. Drugi dan najprije je napravljen postupak povrata antigena. Citratni pufer (pH 6.0, sastava 10 mM natrijev citrat i 0.05% Tween 40) zagrijan je do vrenja. U njega su uronjeni preparati te je inkubacija trajala 10 min, a cijeli postupak je ponovljen 3 puta. Zatim je uslijedilo ispiranje preparata PBS-om 4 puta po 5 min. Blokiranje su epitopi u tkivu kako bi se spriječilo nespecifično vezanje antitijela. Otopina za blokiranje sastojala se od 10%-tnog kozjeg seruma (Sigma Aldrich, SAD) i 0.25%-tnog tritona  $\times 100$  (Sigma Aldrich, SAD) otopljenog u PBS-u, a sam postupak blokiranja je trajao 1 h. Uslijedilo je nanošenje primarnih antitijela u koncentracijama opisanim u **Tablici 7**. Sva primarna antitijela bila su otopljena u otopini 1%-tnog kozjeg seruma i 0.1%-tnog tritona  $\times 100$ . Inkubacija s primarnim antitijelima se odvijala preko noći, na sobnoj temperaturi. Drugi dan preparati su isprani 0.1%-tnom otopinom tritona  $\times 100$  u PBS-u, ispiranje je ponovljeno 5 puta u trajanju od 5 min. Uslijedila je inkubacija sa sekundarnim antitijelima. Sva sekundarna antitijela bila su otopljena u PBS-u (**Tablica 8**), a inkubacija je trajala 2 h na sobnoj temperaturi. S obzirom da su sekundarna antitijela konjugirana s fluoroforima, tijekom daljnjeg postupka preparati su bili zaštićeni od svjetla. Nakon inkubacije uslijedilo je ispiranje u PBS-u 4 puta u trajanju od 5 min. Zatim je nanjena otopina boje DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; 1:2000, 10 mM, Abcam, SAD) u PBS-u i inkubirana 3 min. Uslijedilo je ispiranje PBS-om koje je ponovljeno 3 puta, a preparati su u konačnici uklopljeni u medij za očuvanje fluorescencije (Fluorescence Mounting Medium S3023, DAKO, Danska), poklopljeni pokrovnim staklima (24 $\times$ 50 mm, Biognost, Hrvatska) i pohranjeni na 4°C u neprozirnim kutijama radi zaštite od svjetla.

**Tablica 7:** Popis i pojedinosti primarnih antitijela korištenih za imunohistokemiju.

Primarno antitijelo	Podrijetlo	Klonalnost	Razrjeđenje	Proizvođač	Kataloški broj
CD68	štakor	poliklonalno	1:1000	BioRad	MCA1957
GFAP	kokoš	poliklonalno	1:500	Abcam	Ab4674
IBA1	kunić	poliklonalno	1:100	Wako	LK65732
LUC	miš	monoklonalno	1:50	Santa Cruz Biotechnologies	SC-74548
TLR2	štakor	monoklonalno	1:100	Invitrogen	MA140048

**Tablica 8:** Popis i pojedinosti sekundarnih antitijela korištenih za imunohistokemiju.

Sekundarno antitijelo	Podrijetlo	Klonalnost	Razrjeđenje	Proizvođač	Kataloški broj
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Koza anti miš	poliklonalno	1:500	Invitrogen	A11001
Alexa Fluor <sup>®</sup> 546	Koza anti kokoš	poliklonalno	1:500	Invitrogen	A11040
Alexa Fluor <sup>®</sup> 568	Koza anti štakor	poliklonalno	1:500	Abcam	Ab175476
Alexa Fluor <sup>®</sup> 633	Koza anti kunić	poliklonalno	1:500	Invitrogen	A21070

#### 4.8.4. Konfokalna mikroskopija

Preparati su snimljeni na konfokalnom mikroskopu Olympus FV3000 (Olympus, Japan) korištenjem programa FV31-SW Fluoroview (Olympus, Japan). Najprije su snimljena sva tri presjeka na stakalcima korištenjem objektiva s povećanjem 4× (UPlanSApo, NA 0.16, Olympus, Japan). Zatim su snimljene regije moždane kore, strijatum i hipokampus korištenjem objektiva 40×. Snimljene su navedene regije na ipsilateralnoj hemisferi, kao i odgovarajuće regije na kontralateralnoj hemisferi. Za sve snimke je korištena rezolucija 1024×1024 piksela. Korišteni su ekscitacijski laseri valnih duljina 405 nm (za boju DAPI), 488 nm (za Alexa Fluor<sup>®</sup> 488), 561 nm (za Alexa Fluor<sup>®</sup> 546 i Alexa Fluor<sup>®</sup> 568) i 640 nm (za Alexa Fluor<sup>®</sup> 633). Snimke su spremljene u formatu *tiff*.

#### **4.8.5. Kvantifikacija rezultata imunohistokemije**

Rezultati imunohistokemije kvantificirani su u programu ImageJ. Analizirane su snimke biljega CD68 dobivene objektivom s povećanjem 4×. Hemisfere mozga i hipokampus su manualno ocrtni na svim presjecima mozga. Slike su najprije prebačene 8-bit format koji pretvara sliku u boji u crno-bijelu. Uslijedilo je uklanjanje pozadinskog signala pomoću podešavanja granice nespecifičnog signala i binarizacija nakon čega je na slikama ostao isključivo fluorescentni signal proteina CD68, dok je pozadinski signal uklonjen. Određena je površina dobivenog signala, a izračunata je i sveukupna površina regije od interesa (ipsilateralna i kontralateralna hemisfera mozga te hipokampus). Sukladno tim rezultatima određen je postotak regije od interesa koji je prekriven imunofluorescentnim signalom receptora CD68. Izražaj CD68 na pojedinim hemisferama kvantificiran je tako da su zbrojene površine hemisfera i signala za sva 3 presjeka mozga, te je sukladno tim vrijednostima izračunat rezultat za sveukupni mozak. Za analizu ostalih slika imunohistokemije ko-lokalizacija dva ili više biljega određena je preklapanjem slika istog vidnog polja nakon uklanjanja nespecifičnog pozadinskog signala.

## **4.9. Određivanje koncentracije citokina u krvnoj plazmi**

Korištenjem komercijalnog sustava LEGENDplex™ određena je koncentracija 13 citokina u krvnoj plazmi miševa. Sustav LEGENDplex™ za analizu upalnih citokina koristi metodu višestruke ELISA reakcije. Umjesto klasične reakcije s antitijelima koriste se kuglice obojene različitim koncentracijama fluorescentne boje na koje su konjugirana zarobljavajuća antitijela protiv citokina. Nadalje, streptavidin, koji veže biotin na detekcijskim antitijelima protiv citokina, također je konjugiran s fluorescentnom bojom, različitom od one unutar kuglica. Unutar jedne reakcijske smjese nalazi se nekoliko kuglica s različitim zarobljavajućim antitijelima te se fluorescentni signali detektiraju i kvantificiraju uporabom protočnog citometra. Prednost ove metode u odnosu na klasičnu ELISA reakciju je u tome što se u jednom uzorku krvne plazme može analizirati do 13 proteina, što je omogućilo smanjivanje broja životinja potrebnih za analizu te uzimanje manjeg volumena krvi.

### **4.9.1. Vađenje krvi i izolacija krvne plazme**

Miševi su bili podvrgnuti opetovanom vađenju krvi iz repne vene prije tMCAO te 4 i 8 dana nakon operacije. Vađenje krvi prije tMCAO napravljeno je barem tjedan dana prije operacije kako bi se miševi stigli oporaviti do operacije i vađenja krvi na 4. danu. Na dan 8 krv je izvađena neposredno prije žrtvovanja životinje kako bi se smanjila patnja. Postupak vađenja krvi bio je usklađen s 3Rs smjernicama (137).

Miševi su postavljeni na grijanu podlogu (37°C) i poklopljeni plastičnom kutijom tako da se samo rep nalazio izvan kutije. Rep miša prebrisan je s 70%-tnim etanolom. Napravljen je rez na repnoj veni korištenjem sterilnog kirurškog skalpela i krv se sakupljala pomoću pipete kojoj je vrh prethodno bio obložen otopinom EDTA (Sigma Aldrich, SAD). Sakupljeno je 70 µL krvi koja je stavljena u mikroepruvetu sa 7 µL otopine EDTA (0.05 M, pH 7.4, otopljena u PBS-u). Uzorci su pohranjeni na 4°C i unutar nekoliko sati izolirana je krvna plazma. Za izolaciju krvne plazme uzorci krvi su centrifugirani 10 min na 1000g i na temperaturi 4°C (centrifuga Universal 320R, Hettich, Njemačka). Nakon centrifugiranja eritrociti i bijele krvne stanice bile su u talogu na dnu tube, a prozirna krvna plazma nalazila se u supernatantu. Krvna plazma (ukupno 15-25 µL) je odvojena u sterilne mikroepruvete i pohranjena na -20°C.

#### 4.9.2. Protokol za analizu koncentracije citokina pomoću sustava LEGENDplex™

Određivanje koncentracije citokina u uzorcima krvne plazme provedeno je sustavom LEGENDplex™, pomoću kita *Mouse Inflammation Panel* (BioLegend, SAD). Ovim kitom su određene koncentracije 13 citokina: GM-CSF (stimulirajući faktor staničnih linija granulocita i makrofaga, engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, MCP-1 i TNF- $\alpha$ .

Protokol je proveden prema uputama proizvođača (138). Najprije su pripremljena serijska razrjeđenja otopine sa standardima koja su kasnije korištena za dobivanje standardne krivulje i kvantifikaciju rezultata višestruke ELISA reakcije. Ukupno je bilo 6 serijskih razrjeđenja od 1:4 do 1:4096 (otopine su dobivene razrjeđivanjem po 4 puta), nerazrjeđena otopina standarda poznate koncentracije te pufer za razrjeđivanje (*Assay buffer*) koji je služio kao negativna kontrola. Serijska razrjeđenja otopine standarda dobivena su miješanjem otopine standarda s puferom za razrjeđivanje. Izolirana krvna plazma otopljena je i zagrijana na sobnu temperaturu prije korištenja. Zatim je razrjeđena 4 puta dodavanjem 12.5  $\mu$ L pufer za razrjeđivanje i 25  $\mu$ L otopine matriksa C (*Matrix C*).

Postupak višestruke ELISA reakcije provodio se na pločici s 96 jažica, a svi uzorci krvne plazme i standardi napravljeni su u duplikatima. U jažice s uzorcima krvne plazme dodano je 25  $\mu$ L razrjeđene krvne plazme i 25  $\mu$ L pufera za razrjeđivanje. U jažice sa standardima dodano je 25  $\mu$ L razrjeđenja otopine standarda i 25  $\mu$ L otopine matriksa C. Zatim je u sve uzorke dodano 25  $\mu$ L otopine kuglica sa zarobljavajućim antitijelima tako da je ukupni volumen bio 75  $\mu$ L. Kuglice su bile obilježene različitim koncentracijama fluorescentne boje APC. Pločica je aluminijskom folijom zaštićena od svjetla te inkubirana 2 h na sobnoj temperaturi na miješalici uz brzinu miješanja 800 rpm. Uslijedilo je centrifugiranje u trajanju 5 min na 250g i sobnoj temperaturi. Supernatant je bačen, a talog se resuspendirao dodavanjem 200  $\mu$ L pufera za ispiranje (*Wash buffer*). Ovaj korak je ponovljen dva puta. Nakon ispiranja dodano je 25  $\mu$ L otopine s detekcijskim antitijelima koja su bila konjugirana s biotinom. Pločica je ponovno umotana u aluminijsku foliju i inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi na miješalici uz brzinu 800 rpm. Zatim je dodano 25  $\mu$ L otopine steptavidina koji je bio konjugiran s fluorescentnom bojom PE. Uslijedila je inkubacija u trajanju od 30 min na sobnoj temperaturi uz brzinu miješanja od 800 rpm, a pločica je bila zaštićena od svjetla. Nakon završetka inkubacije uzorci su dva puta isprani s puferom za ispiranje i centrifugirani na 250 g na sobnoj temperaturi. Zatim su resuspendirani u 200  $\mu$ L pufera za ispiranje, a rezultati su analizirani na protočnom citometru.

### 4.9.3. Kvantifikacija rezultata sustava LEGENDplex™

Uzorci pripremljeni kitom LEGENDplex™ analizirani su protočnim citometrom Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Thermo Fischer Scientific, SAD) korištenjem programa Attune NxT Software v. 2.5 (Thermo Fischer Scientific, SAD). Brzina protoka uzorka kroz citometar bila je postavljena na 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Korišteni su ekscitacijski laseri valnih duljina 488 nm i 638 nm te sabirni filteri za valne duljine  $574 \pm 26$  nm (za PE) i  $660 \pm 20$  nm (za APC).

Analiza rezultata LEGENDplex™ provedena je u programu LEGENDplex™ Data Analysis Software Suite (BioLegend, SAD) u skladu s uputama proizvođača (138). Unesene su koncentracije nerazrijeđenih standarda i parametri pripreme razrjeđenja standarda te razrjeđenje krvne plazme. Ručno su za svaki uzorak i standarde prilagođene regije od interesa na grafikonima razvrstavanja stanica. Nakon unosa svih parametara izračunata je povezanost koncentracije standarda i medijana fluorescentnog intenziteta (MFI) boje PE za svih 13 analita zasebno korištenjem regresijskog modela s 5 logističkih parametara (5PL) te su napravljene standardne krivulje. Sukladno tim krivuljama, pomoću dobivenog medijana fluorescentnog intenziteta boje PE u ispitivanim uzorcima krvne plazme određena je koncentracija citokina. S obzirom da su svi uzorci krvne plazme napravljeni u duplikatima, korištena je srednja vrijednost duplikata prilikom daljnje obrade rezultata.

#### 4.10. Statistička obrada podataka

Broj životinja u eksperimentalnim skupinama za metode *in vivo* snimanja određen je *a priori* analizom snage iz rezultata pilot istraživanja. Analiza je provedena u programu GPower 3.1.9.4 (Erdfelder, Faul, & Buchner, Njemačka), a korištena je jačina studije od 95% i statistička značajnost je bila definirana kao  $P < 0.050$ . Rezultati su pokazali da je za procjenu volumena ishemijske lezije i intenziteta bioluminiscentnog signala 2 dana nakon tMCAO potrebno 19 životinja po skupini. Međutim, povećan je dobiveni broj životinja u skupini s obzirom na očekivanu smrtnost te s obzirom da su iste životinje korištene za dvije *in vitro* metode u nekoliko različitih vremenskih točaka.

Normalnost distribucije podataka testirana je Shapiro-Wilk testom i svi podaci su imali normalnu distribuciju. Vrijednosti koje odstupaju su identificirane i isključene metodom ROUT uz interval pouzdanosti od 95%. Statistički značajne razlike za rezultate metoda u kojima su primijenjena ponovljena mjerenja (neurološki deficit, MRI, BLI i višestruka ELISA reakcija) korišten je dvosmjerni ANOVA (analiza varijanci, engl. *analysis of variance*) test za ponovljena mjerenja uz mješoviti model s obzirom da su nedostajali pojedini podaci životinja koje su uginule prije kraja pokusa. Za razlike između vremenskih točaka primijenjena je *post hoc* analiza prema Tukey-u, dok je za razlike između sojeva korišten *post hoc* test prema Sidaku. Za statističku obradu rezultata protočne citometrije i imunohistokemije primijenjen je dvosmjerni ANOVA test za neponovljena mjerenja uz *post hoc* analizu prema Tukey-u. U slučaju nehomogenosti varijanci tijekom višestrukih usporedbi korištena je Geisser-Greenhouse korekcija. Razlike u krivulji preživljenja analizirane su Mantel-Cox testom.

Kako bi se modelirao utjecaj različitih varijabli na mjerene parametre ishoda moždanog udara napravljena je višestruka linearna regresija za bioluminiscenciju, postotak neurološkog oporavka i postotak smanjenja bioluminiscencije. Istovremeno je testirana i multikolinearnost te su svi VIF (od engl. *variance inflation factor*) faktori bili manji od 5, upućujući da nije bila prisutna značajna kolinearnost između varijabli korištenih za predikciju ishoda moždanog udara. Izračunati su Pearsonov koeficijent korelacije (R) čime je određena pozitivna ili negativna povezanost varijabli, kvadrat Pearsonovog koeficijenta ( $R^2$ ) koji je pokazao koliki se udio varijance ovisne varijable može objasniti promjenama neovisne varijable, te promjena  $R^2$  ( $\Delta R^2$ ) nakon dodavanja pojedinih prediktora u model koja pokazuje koliko se povećava prediktivna vrijednost modela nakon uvrštavanja dodatnih neovisnih varijabli. S obzirom da je neurološki deficit kategorička varijabla, za njegovo modeliranje primijenjena je logistička



regresija za kategoričke varijable, a pseudo  $R^2$  koeficijent je izračunat metodom prema Nagelkerke-u. U modelu logističke regresije gledana je značajnost promjene nagiba pravca linearne regresije (B) umjesto Pearsonovog koeficijenta korelacije. Zatim su podaci razvrstani prema soju i vremenskoj točki te je za svaki par podataka zasebno napravljena korelacija i određeni su Pearsonov koeficijent te statistička značajnost korelacije. Niski koeficijent korelacije bio je definiran kao  $R = [-0.49, 0.49]$ , umjereni koeficijent korelacije bio je u intervalima  $R = [-0.69, -0.50]$  i  $[0.50, 0.69]$ , dok se visoki koeficijent korelacije nalazio u rasponima  $R = [-1.00, -0.70]$  i  $[0.70, 1.00]$ .

Statistički značajna razlika bila je definirana kao  $P < 0.050$  za sve podatke. Svi ANOVA testovi, test preživljenja i korelacije provedeni su u programu GraphPad Prism (verzija 8.4.3.686, GraphPad Software, SAD), a višestruka linearna i logistička regresija napravljene su u programu SPSS (verzija 25.0, IBM Corporation, SAD). Svi rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Rezultati ponovljenih mjerenja prikazani su linijskim grafikonima, dok su rezultati neponovljenih mjerenja prikazani stupčastim grafikonima.

## 5. REZULTATI

Rezultati ovog istraživanja odredili su obilježja upalne reakcije posredovane receptorom TLR2 nakon ishemijske lezije mišjeg mozga te ih povezati s veličinom ishemijske lezije i funkcionalnim oporavkom.

Kako bi se ispunio glavni cilj ovog istraživanja, određene su razlike u volumenu ishemijske lezije, neurološkom oporavku i jačini upalnog odgovora posredovanog receptorom TLR2 nakon tMCAO, između miševa divljeg tipa i miševa s onemogućenim receptorom TLR2. Upalni odgovor posredovan receptorom TLR2 longitudinalno praćen je snimanjem *in vivo* bioluminiscencije. Magnetskom rezonancijom određen je volumen ishemijske lezije i edema tijekom akutne i sub-akutne faze moždanog udara. Neurološko stanje miševa praćeno je kroz testove neurološkog deficita i promjenama tjelesne mase. Aktivacija mikroglije nakon moždanog udara i izražaj dodatnih biljega upale posredovane mikroglijom određeni su metodama protočne citometrije i imunohistokemije. Kako bi se istražio utjecaj receptora TLR2 na upalne procese u krvi nakon moždanog udara, određene su koncentracije 13 citokina u krvnoj plazmi miševa korištenjem kita za višestruku ELISA reakciju. Poveznica između jačine upalnog odgovora posredovanog receptorom TLR2 te strukturnih i funkcionalnih ishoda moždanog udara okarakterizirana je primjenom statističkih metoda tj. linearnom regresijom i računanjem korelacija.

## 5.1. Validacija izražaja luciferaze u novoj mišjoj liniji Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc)

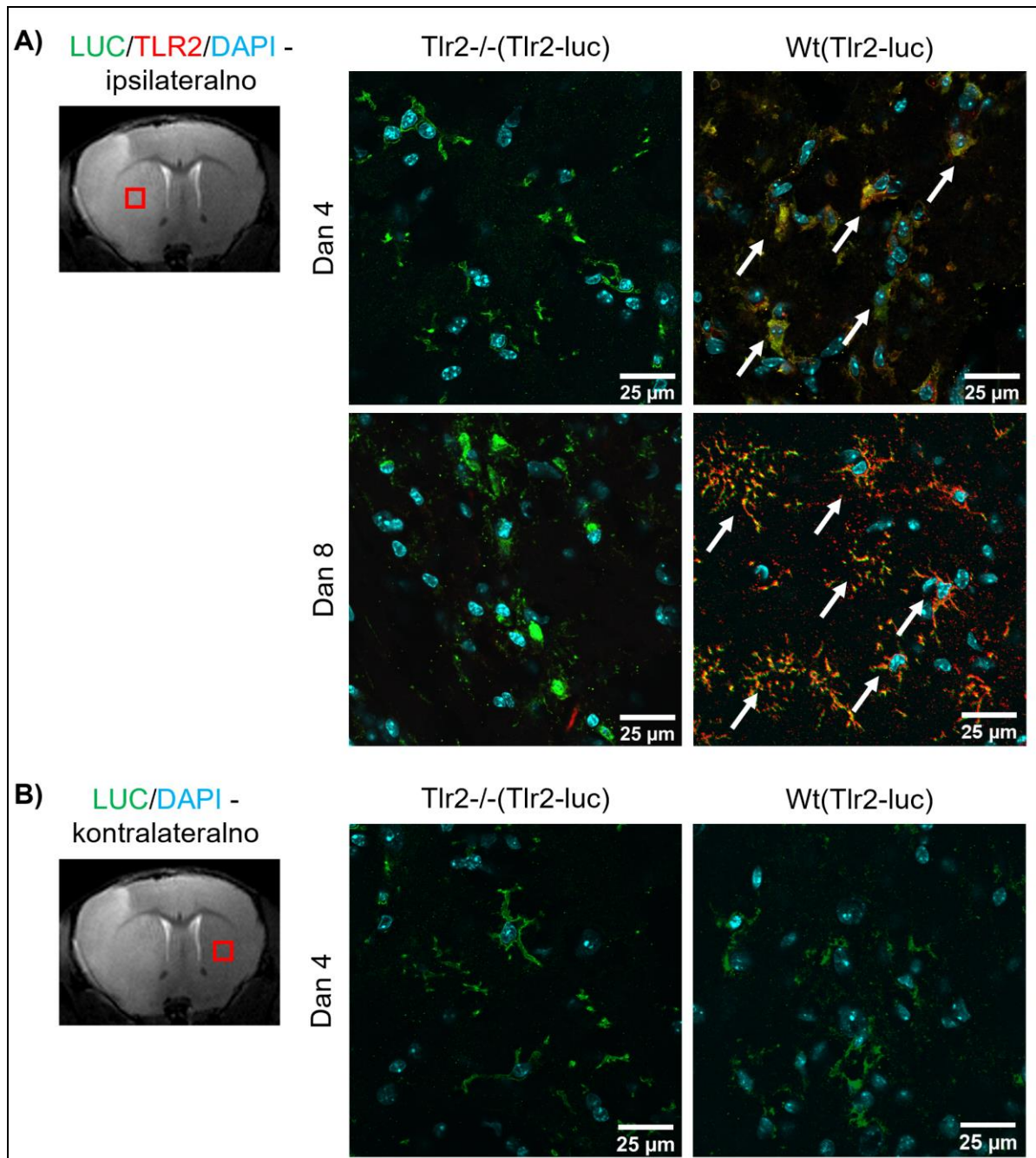
Osnovna karakterizacija novo-dobivene mišje linije Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) napravljena je genotipizacijama iz DNA izolirane iz vrška repa. Nakon gel elektroforeze miševi Wt(Tlr2-luc) su imali dva PCR produkta veličine 499 pb i 300 pb, dok su miševi linije Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) imali PCR produkte veličine 334 pb i 300 pb. Osim genotipizacijama, novo-dobivena mišja linija je dodatno okarakterizirana metodama *in vivo* bioluminiscencije, imunohistokemijom i protočnom citometrijom. Mišja linija Wt(Tlr2-luc) prethodno je korištena u istraživanjima moždanog udara te je dokazana prisutnost receptora TLR2 i okarakterizirana je bioluminiscencija prije i nakon moždanog udara (81, 123, 121). Posljedično, miševi Wt(Tlr2-luc) su u ovim pokusima služili kao pozitivna kontrola izražaja receptora TLR2 i bioluminiscencije.

### 5.1.1. Mišja linija Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) izražava luciferazu unatoč nedostatku receptora TLR2

Potvrda nedostatka receptora TLR2 i izražaja luciferaze kod miševa Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) napravljena je imunohistokemijskim bojenjem mozгова izoliranih 4 i 8 dana nakon tMCAO. Za ovaj pokus korištene su životinje nakon izazivanja ishemijske lezije jer se tada znatno povećava izražaj luciferaze i receptora TLR2 u mozgu, što je povećalo pouzdanost dobivenih rezultata i smanjilo mogućnost lažno-negativnog rezultata (79, 81, 82).

Fluorescentni biljezi za luciferazu i TLR2 analizirani su na ipsilateralnoj hemisferi u području ishemijske lezije. Kod miševa Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) uočen je fluorescentni signal luciferaze 4 i 8 dana nakon moždanog udara, a prema očekivanjima nije bio prisutan fluorescentni signal receptora TLR2 (**Slika 12A**). Time je također potvrđena hipoteza o aktivnosti promotora gena *Tlr2* unatoč nedostatku proteinskog produkta. Štoviše, potvrđeno je da novo-dobivena mišja linija Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) uistinu ne izražava receptor TLR2 što je bilo ključno za daljnje pokuse. Za razliku od miševa Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc), mišja linija Wt(Tlr2-luc) imala je fluorescentni signal za receptor TLR2 u obje promatrane vremenske točke, a uočen je i fluorescentni signal luciferaze (**Slika 12A**). Nadalje, na presjecima mozga soja Wt(Tlr2-luc) bila je prisutna ko-lokalizacija fluorescentnih signala za luciferazu i receptor TLR2 u obje vremenske točke (**Slika 12A**). Ko-lokalizacija ovih biljega bila je sveprisutna čime je potvrđeno da je luciferaza uistinu pouzdan molekularni biljeg izražaja gena *Tlr2* (mjereno prisutnošću luciferaze) i prisutnosti receptora TLR2 (mjereno prisutnošću samog receptora), što je bio temelj daljnjih pokusa

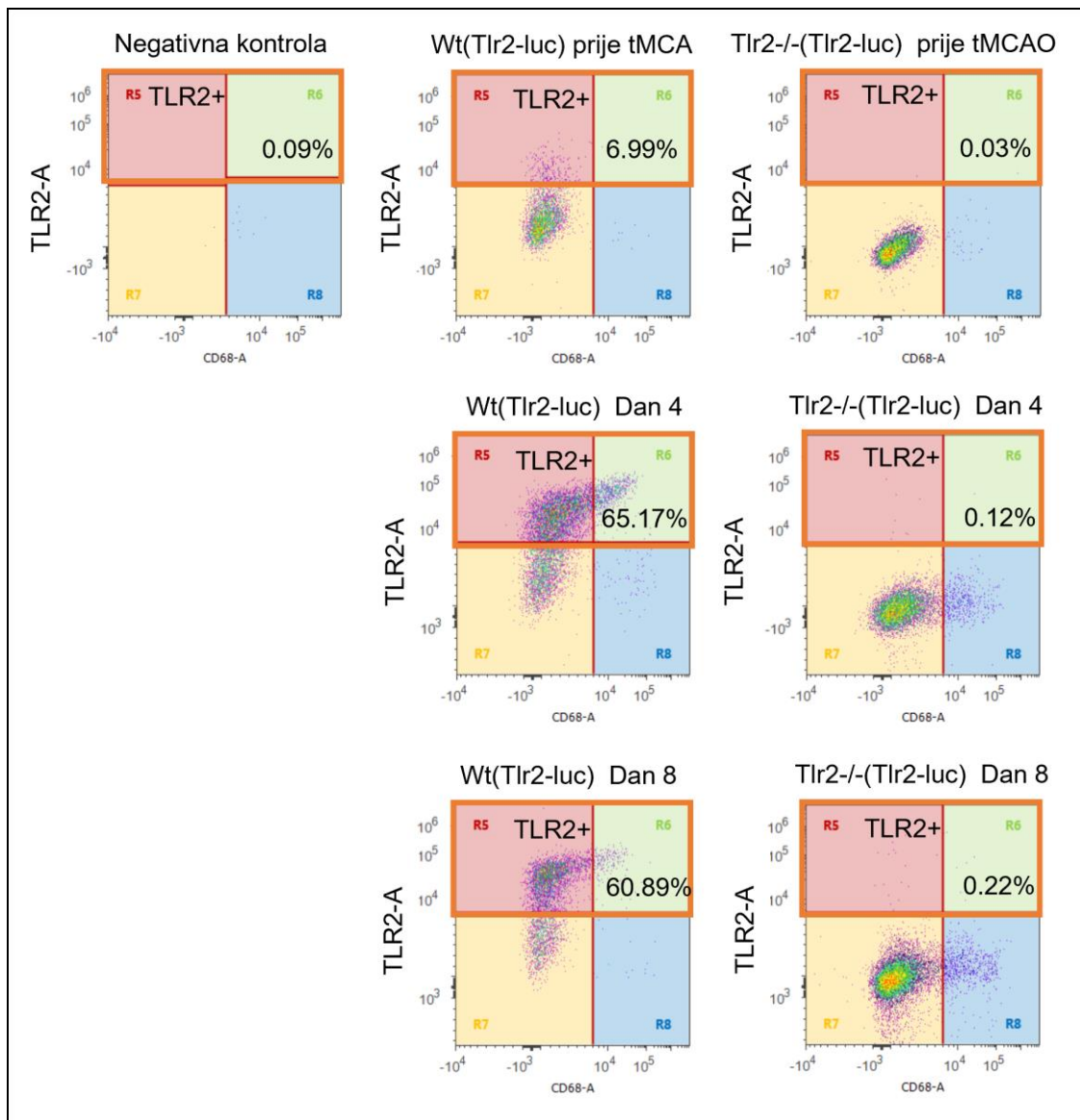
snimanja *in vivo* bioluminiscencije. Izražaj luciferaze također je uočen i na kontralateralnoj hemisferi 4 dana nakon tMCAO kod oba soja, iako je ishemijsko oštećenje bilo prisutno isključivo na ipsilateralnoj hemisferi (Slika 12B).



**Slika 12:** A) Reprezentativni rezultati imunohistokemijskog bojanja mišjih mozgovova za luciferazu izraženu pod kontrolom *Tlr2* promotora (LUC, zeleno) i TLR2 (crveno) 4 i 8 dana nakon tMCAO na ipsilateralnoj hemisferi u području zahvaćenom ishemijskom lezijom. Novodobiveni soj *Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc)* izražavao je luciferazu 4 i 8 dana nakon tMCAO, međutim nije

imao izražaj receptora TLR2. Za razliku od njega, soj Wt(Tlr2-luc) je u obje vremenske točke izražavao luciferazu i receptor TLR2, a uočena je njihova ko-lokalizacija (žuto, označeno bijelim strelicama). **B)** Reprezentativne snimke imunohistokemijskog bojenja luciferaze izražene pod kontrolom *Tlr2* promotora (zeleno) na kontralateralnoj hemisferi miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) 4 dana nakon tMCAO. Unatoč prisutnosti ishemijske lezije isključivo na ipsilateralnoj hemisferi, luciferaza je bila izražena i na kontralateralnoj hemisferi.

Nedostatak receptora TLR2 u mišjoj liniji Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) dodatno je potvrđen metodom protočne citometrije. Analiziran je izražaj receptora TLR2 na stanicama mikroglije izolirane iz mišjih mozгова prije izazivanja ishemije te 4 i 8 dana nakon tMCAO. Rezultati soja Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) uspoređeni su s vrijednostima miševa Wt(Tlr2-luc), koji su u ovom pokusu bili pozitivna kontrola izražaja receptora TLR2. Miševi Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) su na protočnoj citometriji pokazali samo nespecifičan, pozadinski signal u svim vremenskim točkama, koji je bio usporediv s vrijednostima negativne kontrole i znatno manji u odnosu na vrijednosti dobivene kod životinja Wt(Tlr2-luc) (**Slika 13**). Time su dodatno potvrđeni rezultati imunohistokemije.

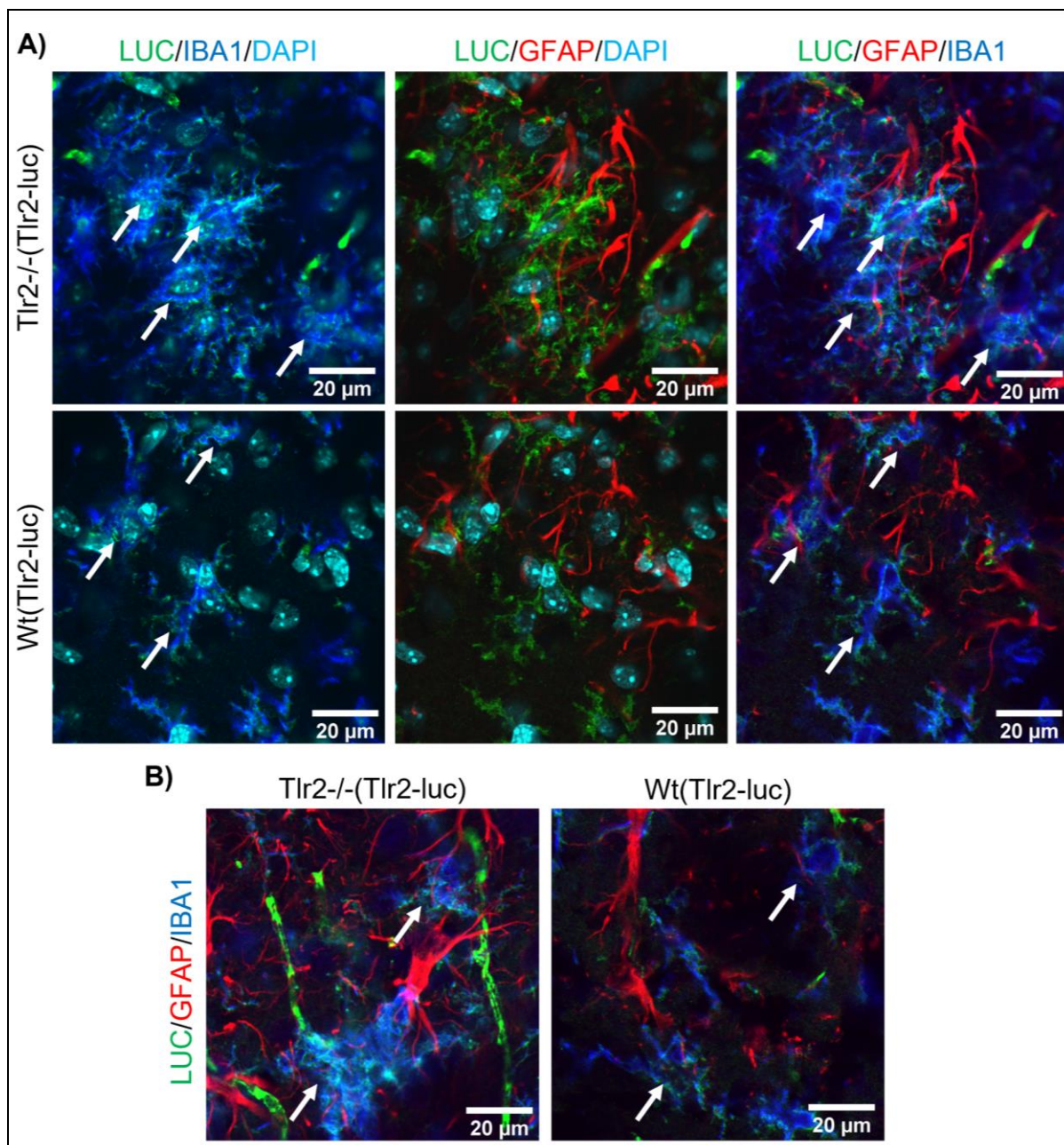


**Slika 13:** Reprezentativni rezultati protočne citometrije kojom je kvantificiran udio mikroglije koja izražava receptor TLR2. Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) je u svim vremenskim točkama imao izražaj receptora TLR2 usporediv s vrijednostima negativne kontrole. S druge strane miševi Wt(Tlr2-luc) su imali znatno veći udio TLR2<sup>+</sup> mikroglije prije izazivanja ishemijske tMCAO, koji se dodatno povećao nakon tMCAO. Negativna kontrola je pripremljena na isti način kao i ispitivani uzorci, ali nisu dodana antitijela obilježena fluorescentnom bojom.

### 5.1.2. Luciferaza je izražena isključivo u stanicama mikroglije

Idući cilj bio je odrediti koje vrste stanica u mozgu miševa izražavaju luciferazu. Napravljeno je imunohistokemijsko bojenje mišjih mozgova korištenjem fluorescentno obilježenih antitijela za biljeg mikroglije IBA1, biljeg astrocita GFAP i luciferazu (LUC). Preklapanjem

fluorescentnih signala ovih biljega je određeno u kojoj vrsti stanica je došlo do izražaja luciferaze. Analizirani su mišji mozgovi sojeva Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) izolirani 4 i 8 dana nakon tMCAO kako bi se ustvrdilo dolazi li do promjena izražaja luciferaze u različitim stanicama središnjeg živčanog sustava ovisno o nedostatku receptora TLR2 ili o vremenu nakon izazivanja moždanog udara. Izražaj navedenih biljega promatran je na ipsilateralnoj hemisferi u području zahvaćenom ishemijskom lezijom. Uočena je ko-lokalizacija luciferaze isključivo s IBA1, tj. izražaj luciferaze bio je prisutan isključivo u stanicama mikroglije (**Slika 14**). Nije bilo ko-lokalizacije luciferaze s biljegom astrocita GFAP. Isti rezultat dobiven je za mišje lijine Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) te u obje vremenske točke nakon tMCAO (**Slika 14**). Nedostatak receptora TLR2 kao niti vrijeme proteklo od izazivanja ishemije nisu doveli do promjena u vrsti stanica koje izražavaju luciferazu.

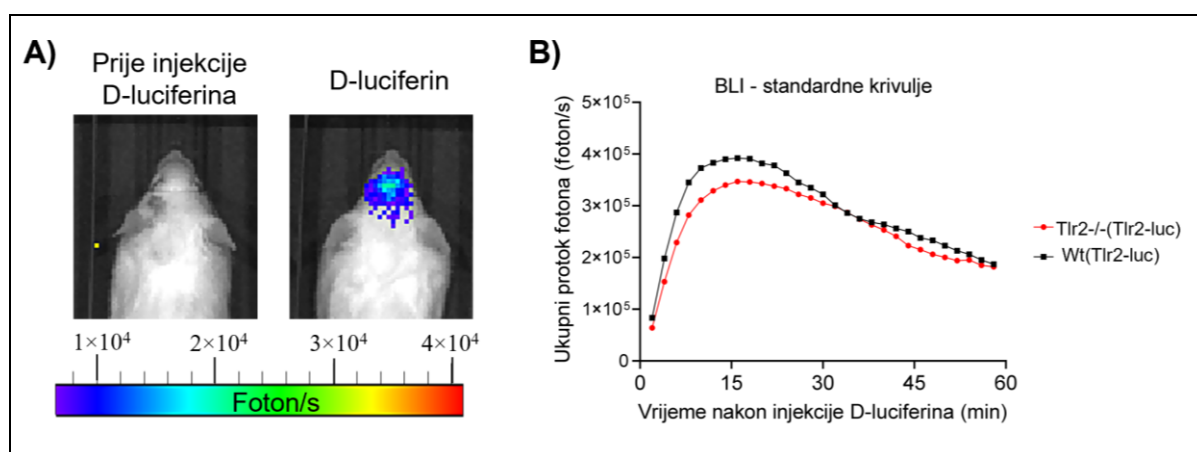


**Slika 14:** Rezultati imunohistokemijskog bojanja luciferaze (LUC), biljega mikroglije (IBA1) te astrocita (GFAP) na ipsilateralnoj hemisferi u području zahvaćenom ishemijskom lezijom 4 (**A**) i 8 (**B**) dana nakon tMCAO. **A)** Luciferaza (zeleno) je zasebno preklopljena s biljgom mikroglije (IBA1, tamno plavo) i biljgom astrocita (GFAP, crveno) te su u 3. stupcu preklopljene slike sva tri biljega. Signal luciferaze ko-lokalizirao je isključivo s biljgom mikroglije IBA1 (svijetloplavi signal, označeno bijelim strelicama) kod sojeva Wt(Tlr2-luc) i Tlr2-/- (Tlr2-luc). **B)** Reprezentativne preklopljene slike LUC, IBA1 i GFAP 8 dana nakon tMCAO. Luciferaza je ponovno ko-lokalizirala isključivo s IBA1 (mikroglijom, označeno bijelim strelicama) kod sojeva Wt(Tlr2-luc) i Tlr2-/- (Tlr2-luc).



### 5.1.3. Nedostatak receptora TLR2 nije promijenio bazalni bioluminiscentni signal

Enzimaska aktivnost luciferaze u novoj mišjoj liniji Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) validirana „snimanjem *in vivo* bioluminiscencije mišjeg mozga. Mišje linije Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) snimane su prije tMCAO zahvata s obzirom da metoda bioluminiscencije ima veliku osjetljivost i za razliku od imunohistokemije može detektirati manje količine signala. Nakon injekcije D-luciferina signal je bio prisutan u obje mišje linije čime se dodatno potvrdio izražaj te enzimska aktivnost luciferaze u mišjoj liniji Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) (**Slika 15**). Izgled krivulje ovisnosti intenziteta bioluminiscencije o vremenu nakon injekcije D-luciferina nije se razlikovao između sojeva. Oba soja su maksimum bioluminiscencije dosegnula 16 minuta nakon injekcije D-luciferina nakon čega je signal počeo postepeno opadati (**Slika 15B**). Za kvantifikaciju rezultata izračunat je ukupni protok fotona tijekom cijelog perioda snimanja bioluminiscencije, tj. površina ispod krivulje ovisnosti protoka fotona o vremenu proteklom nakon injekcije D-luciferina (**Slika 15B**). Intenzitet bioluminiscentnog signala bio je nešto manji kod soja Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) ( $1.50 \times 10^7 \pm 5.18 \times 10^6$  foton/s) u odnosu na životinje Wt(Tlr2-luc) ( $1.65 \times 10^7 \pm 4.50 \times 10^6$  foton/s), međutim ova razlika nije bila statistički značajna ( $P = 0.660$ ). Nakon injekcije D-luciferina bioluminiscencija kod miševa Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) znatno se povećala u odnosu na snimke prije injekcije (**Slika 15A**). Ovi rezultati su potvrdili da je novo-dobivena mišja linija dobar model za *in vivo* praćenje izražaja promotora gena *Tlr2* bez prisutnosti proteinskog produkta te da je bazalni izražaj luciferaze mjereno metodom *in vivo* bioluminiscencije bio usporediv s linijom Wt(Tlr2-luc).

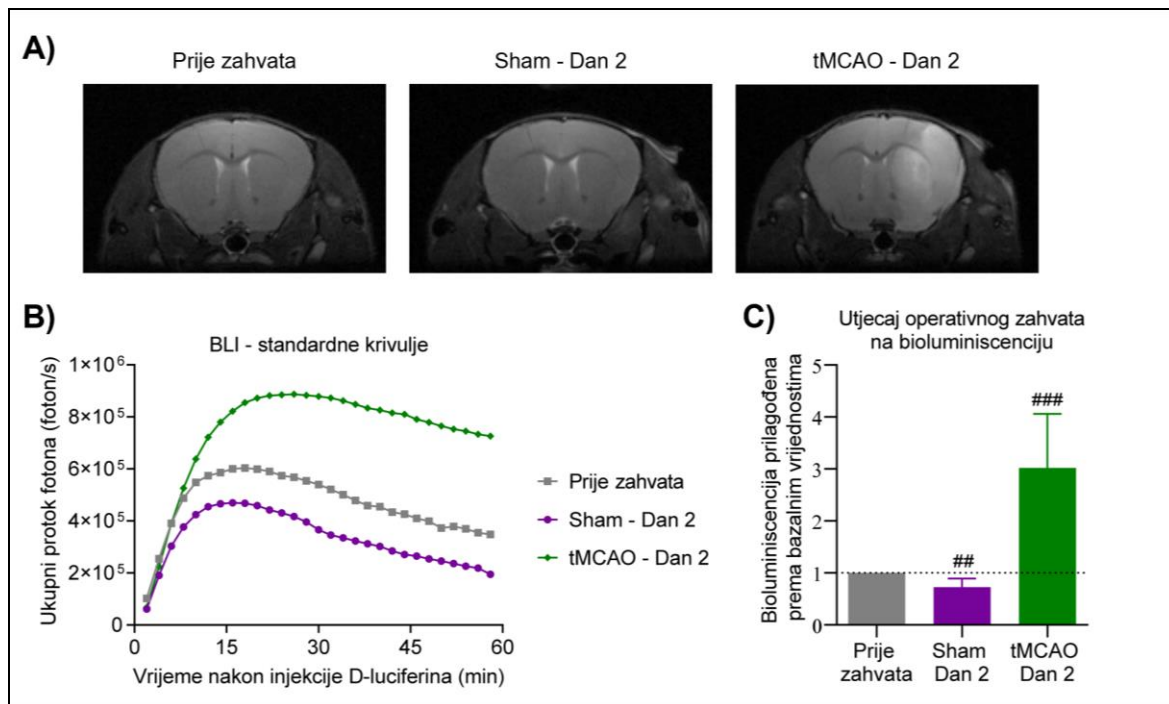


**Slika 15:** Reprezentativni rezultati *in vivo* bioluminiscencije za novo-dobivenu Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) mišju liniju snimljeni prije izazivanja moždanog udara. **A)** Reprezentativne snimke bioluminiscencije prije i nakon injekcije D-luciferina kod miševa Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc).

Bioluminiscentni signal je supraponiran na fotografske snimke miške glave. Prije injekcije D-luciferina bio je prisutan samo nespecifičan pozadinski šum. Nakon injekcije D-luciferina detektiran je bioluminiscentni signal. **B)** Standardne krivulje ovisnosti protoka fotona o vremenu nakon injekcije D-luciferina za sojeve Wt(Tlr2-luc) i Tlr2-/(Tlr2-luc) prije izazivanja moždanog udara. Standardne krivulje su dobivene računanjem srednjih vrijednosti bioluminiscencije za sve miševe u eksperimentalnoj skupini. Oba soja su imala sličnu standardnu krivulju, a površina ispod krivulje (ukupni protok fotona) je bila nešto manja kod soja Tlr2-/(Tlr2-luc).

Gledajući sveukupne rezultate karakterizacije nove miške linije Tlr2-/(Tlr2-luc), potvrđen je nedostatak receptora TLR2 uz istovremeni izražaj luciferaze. Nadalje, potvrđena je enzimaska aktivnost luciferaze u *in vivo* uvjetima kod miške linije Tlr2-/(Tlr2-luc). Intenzitet bioluminiscentnog signala prije izazivanja ishemijske ozljede bio je usporediv s prethodno opisanom mišjom linijom Wt(Tlr2-luc), te je kod oba soja nakon izazivanja moždanog udara potvrđen izražaj luciferaze isključivo u stanicama mikroglije. Temeljem ovih rezultata može se zaključiti da je novo-dobivena mišja linija Tlr2-/(Tlr2-luc) po svim parametrima važnima za ovo istraživanje bila usporediva s miševima Wt(Tlr2-luc) te da se može primijeniti u daljnjim pokusima kao model nedostatka receptora TLR2.

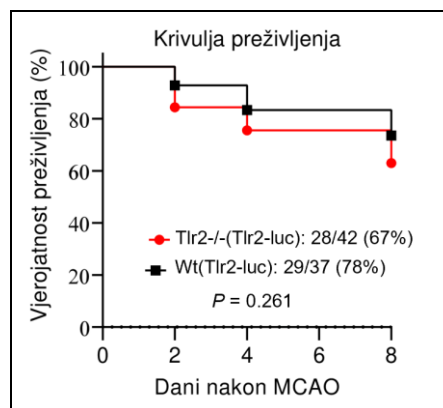
Kako bi se potvrdilo da je povećanje bioluminiscencije nakon tMCAO operacije isključivo posljedica razvoja ishemijske lezije, a ne samog zahvata, izmjerena je bioluminiscencija sham i tMCAO operiranih životinja prije te 2 dana nakon operacije, kada se prema podacima u literaturi očekuje najveći bioluminiscentni signal (79). Nedostatak ishemijske lezije nakon sham operacije potvrđen je snimanjem magnetske rezonancije (**Slika 16A**). Gledajući standardne krivulje bioluminiscencije vidljivo je smanjenje bioluminiscentnog signala 2 dana nakon sham operacije u odnosu na bazalne vrijednosti, a istovremeno je došlo do povećanja bioluminiscencije 2 dana nakon tMCAO operacije (**Slika 16B**). Nadalje, kvantifikacija bioluminiscentnog signala potvrdila je da 2 dana nakon sham operacije dolazi do značajnog pada bioluminiscencije ( $0.73 \pm 0.17$ ,  $P = 0.006$ ) u odnosu na vrijednosti prije operacije, dok je tMCAO operacija dovela do značajnog povećanja bioluminiscencije u odnosu na bazalne vrijednosti ( $3.02 \pm 1.04$ ,  $P < 0.001$ ) (**Slika 16C**). Ovime je pokazano da sama operacija nije uzrokovala aktivaciju upalnog odgovora posredovanog receptorom TLR2, već je povećanje bioluminiscencije nakon tMCAO isključivo posljedica razvoja ishemijske lezije.



**Slika 16:** Rezultati *in vivo* snimanja životinja koje su bile podvrgnute lažnoj operaciji (sham) ili tMCAO. Snimanja su napravljena prije zahvata te 2 dana nakon lažne operacije ili tMCAO. **A)** Reprezentativne MR snimke (T2 ponderirane) mišjeg mozga prije zahvata i 2 dana nakon lažne ili tMCAO operacije. Lažna operacija nije uzrokovala razvoj ishemijske lezije, za razliku od tMCAO zahvata nakon kojeg je bila vidljiva ishemijska lezija na lijevoj hemisferi (hiperintenzivni signal na MR snimci). **B)** Standardne krivulje ovisnosti bioluminiscentnog signala o vremenu nakon injekcije D-luciferina. **C)** Kvantifikacija bioluminiscentnog signala prikazana kao bioluminiscencija (ukupni protok fotona, foton/s) 2 dana nakon lažne ili tMCAO operacije normalizirana na vrijednosti prije zahvata. Lažni zahvat je doveo do značajnog pada bioluminiscencije u odnosu na početne vrijednosti, dok je s druge strane tMCAO operacija uzrokovala povećanje bioluminiscencije u odnosu na početne vrijednosti. # - značajno u odnosu na bazalne vrijednosti; # -  $P < 0.050$ , ## -  $P < 0.010$ , ### -  $P < 0.001$ , dobiveno parametrijskim t-testom za uparena mjerenja.

## 5.2. Nedostatak receptora TLR2 ne utječe na preživljenje nakon ishemijske ozljede mozga

U pokusima ove disertacije ukupno je 79 životinja bilo podvrgnuto tMCAO zahvatu i zadovoljilo sve uvjete uključivanja u pokuse. Kod miševa divljeg tipa njih 29/37 (78%) je doživjelo kraj pokusa dok je preostalih 8/37 (22%) uginulo (**Slika 17**). U skupini miševa Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) njih 28/42 (67%) je preživjelo dok je 14/42 (33%) uginulo prije završetka pokusa (**Slika 17**). Ovi rezultati ukazuju na nešto bolji postotak preživljenja kod miševa divljeg tipa, međutim analiza krivulje preživljenja korištenjem Mantel-Cox testa nije pokazala značajnu razliku u preživljenju između sojeva ( $P = 0.261$ ) te se može zaključiti da nedostatak receptora TLR2 nije imao utjecaj na preživljenje miševa u akutnoj fazi ishemijske ozljede mozga.



**Slika 17:** Krivulja preživljenja miševa nakon ishemijske ozljede mozga. Rezultati su prikazani kao vjerojatnost preživljenja u odnosu na vrijeme proteklo nakon tMCAO (u danima). Nisu uočene značajne razlike u preživljavanju između sojeva Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) i Wt(Tlr2-luc) ( $P = 0.261$ , dobiveno Mantel-Cox testom).

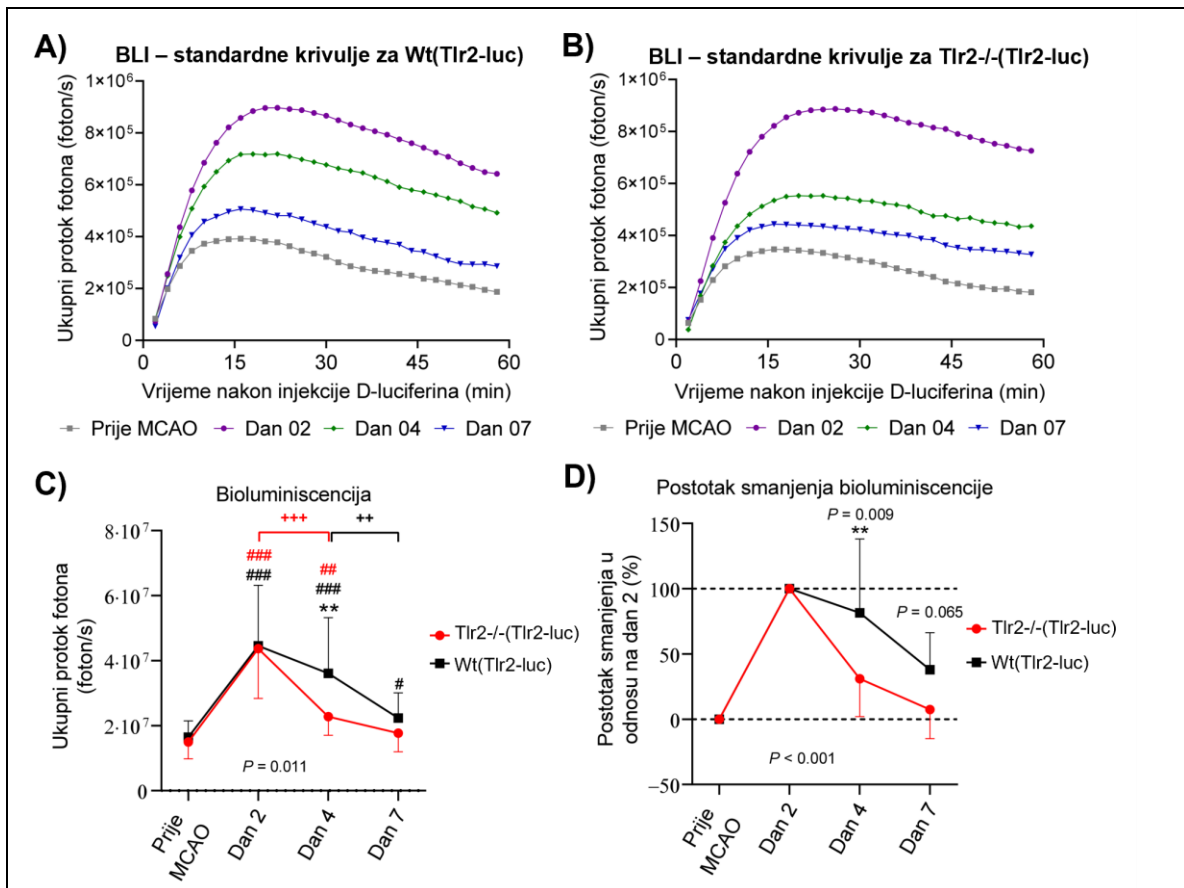
### 5.3. Nedostatak receptora TLR2 pospješuje smanjenje upale nakon moždanog udara

#### 5.3.1. Miševi *Tlr2*<sup>-/-</sup>(*Tlr2*-luc) imaju veći postotak smanjenja bioluminiscentnog signala nakon ishemijske ozljede

Kako bi se odredio utjecaj nedostatka receptora TLR2 na upalne procese posredovane mikroglijom nakon moždanog udara, aktivnost gena *Tlr2* praćena je longitudinalno metodom *in vivo* bioluminiscencije tijekom 7 dana nakon moždanog udara kod miševa *Wt*(*Tlr2*-luc) i *Tlr2*<sup>-/-</sup>(*Tlr2*-luc). U ovom istraživanju bioluminiscencija je bila mjera jačine upale posredovane mikroglijom. Najprije je određen intenzitet upale u cijelom mozgu. Prilikom kvantifikacije rezultata bioluminiscencije, regija od interesa postavljena je tako da prekriva cijelu glavu miša. Standardne krivulje bioluminiscentnog signala dobivene tijekom pojedinačnog mjerenja pokazale su da oba soja imaju usporedive oblike krivulja u svim mjerenjima, koje dosežu maksimum između 15. i 20. minute nakon injekcije D-luciferina (**Slika 18A i B**). Razina bioluminiscencije kvantificirana je mjerenjem površine ispod krivulje.

Kod oba soja došlo je do značajnog povećanja bioluminiscencije nakon moždanog udara u odnosu na bazalne vrijednosti, upućujući na povećanje aktivnosti promotora gena *Tlr2*. Kod oba soja najveća bioluminiscencija bila je prisutna 2 dana nakon tMCAO te je postupno opadala do 7. dana. Uočena je manja bioluminiscencija nakon moždanog udara kod miševa s nedostatkom receptora TLR2 u odnosu na *Wt*(*Tlr2*-luc) ( $P = 0.011$ ), a najveća razlika bila je prisutna 4 dana nakon moždanog udara (**Slika 18C**). Ukupni protok fotona na dan 4 kod miševa divljeg tipa je iznosio  $3.61 \times 10^7 \pm 1.71 \times 10^7$  foton/s, dok je kod miševa *Tlr2*<sup>-/-</sup>(*Tlr2*-luc) iznosio  $2.27 \times 10^7 \pm 5.71 \times 10^6$  foton/s ( $P = 0.008$ ). Najveći signal bio je prisutan 2 dana nakon moždanog udara, međutim dinamika smanjenja bioluminiscencije promijenila prilikom se nedostatka funkcionalnog receptora TLR2. Kod *Tlr2*<sup>-/-</sup>(*Tlr2*-luc) miševa prije je došlo do značajnog smanjenja bioluminiscencije. Uočen je pad signala između dana 2 ( $4.37 \times 10^7 \pm 1.53 \times 10^7$  foton/s) i 4 ( $2.27 \times 10^7 \pm 5.71 \times 10^6$  foton/s) ( $P < 0.001$ ), a do dana 7 ( $1.77 \times 10^7 \pm 5.74 \times 10^6$  foton/s) intenzitet signala bio je usporediv s bazalnom vrijednošću ( $1.50 \times 10^7 \pm 5.18 \times 10^6$  foton/s) (**Slika 18C**). Kod miševa *Wt*(*Tlr2*-luc) bioluminiscencija se značajno smanjila ( $P = 0.002$ ) između dana 4 ( $3.61 \times 10^7 \pm 1.71 \times 10^7$  foton/s) i 7 ( $2.24 \times 10^7 \pm 7.76 \times 10^6$  foton/s), s time da su vrijednosti na dan 7 svejedno bile značajno veće ( $P = 0.047$ ) u odnosu na bazalnu vrijednost ( $1.65 \times 10^7 \pm 4.50 \times 10^6$  foton/s) (**Slika 18C**). Ovi rezultati ukazuju da nedostatak receptora TLR2 dovodi do smanjene aktivacije promotora gena *Tlr2* nakon ishemijske lezije

mišjeg mozga. Aktivacija promotora *Tlr2* nije potpuno inhibirana nedostatkom proteinskog produkta, međutim dolazi do ranijeg utišavanja aktivnosti promotora nakon izazivanja ishemijske lezije.



**Slika 18:** Rezultati *in vivo* bioluminiscencije za miševe Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) izmjereni u regijama od interesa koje prekrivaju cijeli mozak miševa. Standardne krivulje ovisnosti ukupnog protoka fotona o vremenu nakon injekcije D-luciferina prije tMCAO (sivo) te 2 (ljubičasto), 4 (zeleno) i 7 dana (plavo) nakon ishemijske lezije kod miševa Wt(Tlr2-luc) (A) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) (B). C) Promjena ukupnog protoka fotona mjenjenog metodom bioluminiscencije u ovisnosti o vremenu nakon tMCAO kod miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc). Vidljivo je da postoji statistički značajna razlika između miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) 4 dana nakon tMCAO. D) Stopa smanjenja bioluminiscencije u ovisnosti o vremenu nakon tMCAO kod miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc). Kod miševa Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) je vidljivo značajno smanjenje bioluminiscencije 4 dana nakon tMCAO u odnosu na miševe Wt(Tlr2-luc). Sve vrijednosti bioluminiscencije su prilagođene prema vrijednosti dobivenoj 2 dana nakon ishemijske lezije. # - značajno u odnosu na bazalne vrijednosti, \* - značajna razlika između sojeva, + -

značajna razlika između vremenskih točaka; #\*/+ -  $P < 0.050$ , ##/\*\*/++ -  $P < 0.010$ , ###/\*\*\*/+ + + -  $P < 0.001$ , dobiveno dvosmjernim ANOVA testom za ponovljena mjerenja uz *post-hoc* analizu prema Sidaku (\*) ili prema Tukey-u (# i +).

Kako bi se ustvrdilo koje sve varijable utječu na bioluminiscenciju nakon moždanog udara, primijenjeno je statističko modeliranje višestrukom linearnom regresijom. Bioluminiscencija je modelirana pomoću alokacije prema soju (tj. nedostatka receptora TLR2), vremena nakon tMCAO te volumena ishemijske lezije. Sveukupni model objasnio je 38.6% varijance bioluminiscencije ( $R = 0.621$ ,  $P < 0.001$ ), a vrijeme nakon tMCAO (20.7% varijance,  $P < 0.001$ ) i volumen lezije (17.8% varijance,  $P < 0.001$ ) su značajno pridonijeli predikciji bioluminiscencije, dok uključivanje alokacije prema soju nije povećalo prediktivnu vrijednost modela (0.1% varijance,  $P = 0.751$ ). Vrijeme nakon tMCAO je pokazalo negativnu korelaciju ( $R = -0.455$ ,  $P < 0.001$ ), dok je volumen ishemijske lezije pozitivno korelirao s bioluminiscencijom ( $R = 0.523$ ,  $P < 0.001$ ). Nedostatak receptora TLR2 nije pokazao značajnu korelaciju s intenzitetom bioluminiscencije ( $R = -0.027$ ,  $P = 0.376$ ). Ovakvi rezultati ukazuju da se bioluminiscencija smanjuje tijekom vremena, a razvoj većeg ishemijskog oštećenja povezan je s većom bioluminiscencijom. Također, ovaj model pokazuje da nedostatak receptora TLR2 nije znatno promijenio bioluminiscenciju.

S obzirom da je linearna regresija pokazala utjecaj vremena nakon tMCAO, te su uočene razlike u vremenskoj dinamici promjene bioluminiscencije između sojeva, sve vrijednosti bioluminiscencije bile su prilagođene prema vrijednosti izmjerenoj 2 dana nakon moždanog udara. Time je pokazan postotak smanjenja aktivacije promotora *Tlr2* u odnosu na maksimalnu zabilježenu aktivaciju, tj. postotak upalnog odgovora posredovanog receptorom TLR2 nakon moždanog udara. Rezultati ukazuju na veći postotak smanjenja bioluminiscencije nakon moždanog udara kod miševa *Tlr2*<sup>-/-</sup>(*Tlr2*-luc) u odnosu na *Wt*(*Tlr2*-luc) ( $P < 0.001$ ), a najveća razlika između sojeva uočena je 4 dana nakon moždanog udara ( $30.98 \pm 28.96\%$  za *Tlr2*<sup>-/-</sup>(*Tlr2*-luc) i  $81.51 \pm 56.55\%$  za *Wt*(*Tlr2*-luc);  $P = 0.009$ ) (**Slika 18D**). Iz navedenih rezultata može se zaključiti da nedostatkom receptora TLR2 dolazi do bržeg smanjenja upalnog odgovora u odnosu na kontrolnu skupinu.

Kako bi se upotpunili rezultati smanjenja upale i identificirali dodatni parametri koji moduliraju postotak smanjenja bioluminiscencije nakon ishemijske lezije, primijenjeno je statističko

modeliranje višestrukom linearnom regresijom. Ispitan je utjecaj nedostatka receptora TLR2, vremena proteklog nakon tMCAO i volumena ishemijske lezije na postotak smanjenja bioluminiscencije. Sveukupnim modelom predviđeno je 53.2% ( $P < 0.001$ ) varijance u postotku smanjenja bioluminiscencije, s time da je nedostatak receptora TLR2 objasnilo 3.1% varijance ( $P = 0.040$ ), vrijeme nakon tMCAO je objasnilo dodatnih 38.3% varijance ( $P < 0.001$ ), a volumen ishemijske lezije je predvidio 9.8% ( $P = 0.033$ ) varijance. Sve ispitane varijable su imale značajnu korelaciju s postotkom smanjenja bioluminiscencije. Alokacija životinja prema soju imala je negativni Pearsonov koeficijent korelacije ( $R = -0.176$ ,  $P = 0.020$ ), upućujući da su miševi Tlr2-/(Tlr2-luc) imali veći postotak smanjenja bioluminiscencije, što je bilo u skladu s rezultatima ANOVA testa. Vrijeme proteklo nakon tMCAO također je imalo negativni Pearsonov koeficijent ( $R = -0.619$ ,  $P < 0.001$ ) upućujući da se postotak smanjenja bioluminiscencije povećavao tijekom vremena. Volumen ishemijske lezije imao je pozitivan Pearsonov koeficijent korelacije ( $R = 0.280$ ,  $P < 0.001$ ) čime je pokazano da se kod miševa s većim ishemijskim lezijama bioluminiscencija smanjuje sporije.

### **5.3.2. Ishemijska ozljeda pojačava bioluminiscenciju na ipsilateralnoj i kontralateralnoj hemisferi**

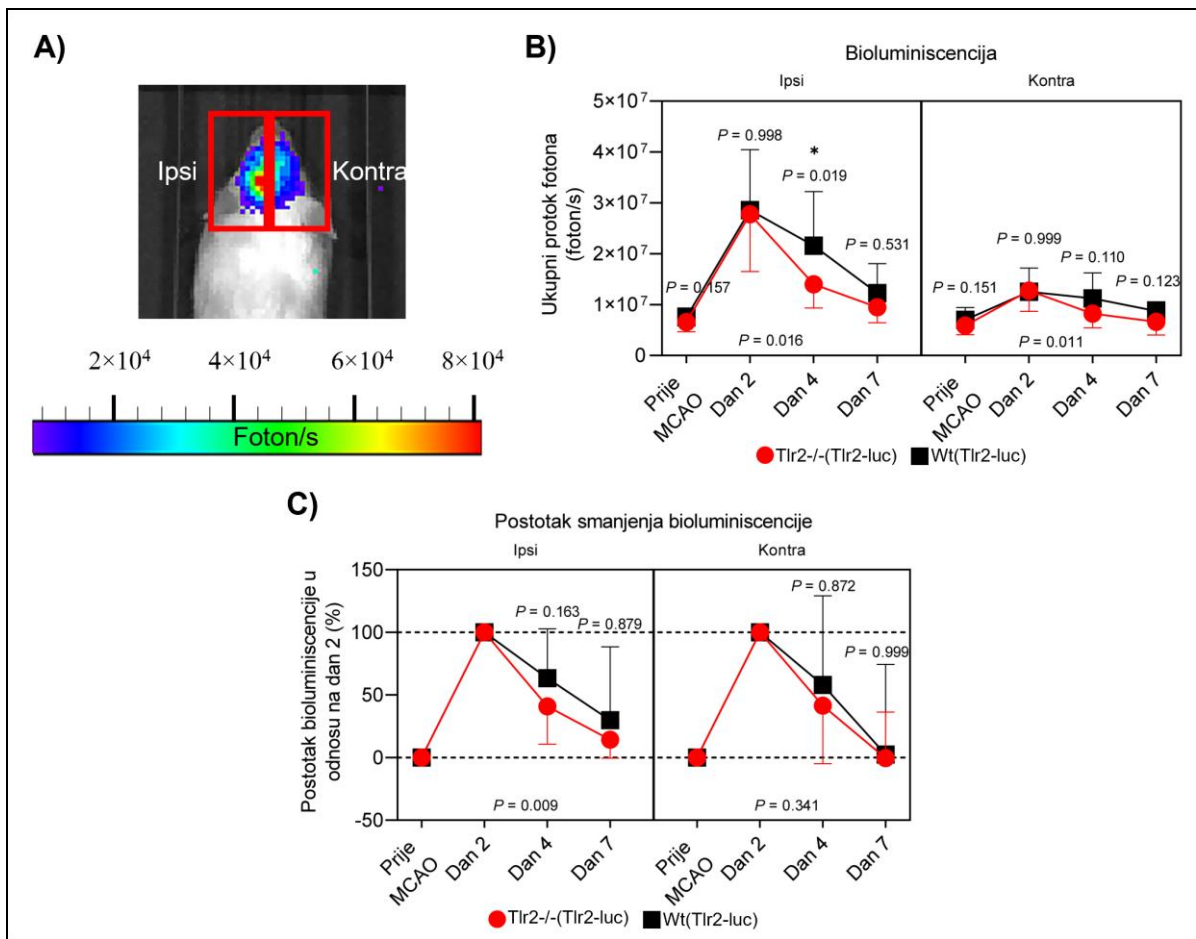
Snimke bioluminiscencije dodatno su analizirane postavljanjem manjih regija od interesa kako bi se odredila bioluminiscencija za svaku hemisferu zasebno s obzirom da je imunohistokemijom pokazan izražaj luciferaze na ipsilateralnoj i na kontralateralnoj hemisferi nakon izazivanja moždanog udara. Treba napomenuti da se na slikama za analizu bioluminiscencije nije mogla posve precizno odrediti granica između dvije hemisfere pošto je bioluminiscentni signal bio supraponiran na fotografiju mišje glave snimljenu u medijalnoj ravnini. Ovakve fotografije ne pružaju dostatni uvid u anatomiju mozga. Regije od interesa su postavljene tako da je granica hemisfera prolazila sredinom njuške miša u medijalnoj ravnini kako bi se osigurali konzistentni rezultati (**Slika 19A**), a rezultati bioluminiscencije potom su provjereni imunohistokemijom kojom je potvrđen izražaj luciferaze na obje hemisfere (opisano u poglavlju 5.1) i protočnom citometrijom koja je pokazala izražaj receptora TLR2 (izražaj luciferaze indirektna je mjera izražaja receptora TLR2) u obje hemisfere kod Wt(Tlr2-luc) miševa (poglavlje 5.3.3).

Analiza apsolutnih vrijednosti bioluminiscencije pokazala je povećanje na ipsilateralnoj i kontralateralnoj hemisferi kod oba soja nakon moždanog udara. Na ipsilateralnoj hemisferi



bioluminiscencija je bila značajno povećana kod oba soja 2 i 4 dana nakon moždanog udara u odnosu na bazalne vrijednosti, a do dana 7 signal je bio usporediv s bazalnim vrijednostima (**Slika 19B**). Soj Wt(Tlr2-luc) je pokazao veći intenzitet bioluminiscencije na ipsilateralnoj hemisferi u odnosu na Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) miševe ( $P = 0.016$ ), a najveća razlika je uočena 4 dana nakon MCAO ( $2.16 \times 10^7 \pm 1.06 \times 10^7$  foton/s za Wt(Tlr2-luc) i  $1.40 \times 10^7 \pm 4.65 \times 10^6$  foton/s za Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc);  $P = 0.019$ ). Iako je ishemija bila prisutna isključivo na ipsilateralnoj hemisferi, uočeno je povećanje bioluminiscencije i na kontralateralnoj hemisferi, ali je signal kod oba soja bio značajno manji u odnosu na ipsilateralnu hemisferu ( $P < 0.001$ ). Povećanje bioluminiscencije na kontralateralnoj hemisferi u odnosu na bazalne vrijednosti bilo je prisutno isključivo 2 dana nakon tMCAO kod oba soja ( $1.25 \times 10^7 \pm 4.65 \times 10^6$  foton/s za Wt(Tlr2-luc) i  $1.28 \times 10^7 \pm 4.07 \times 10^6$  foton/s za Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc)) (**Slika 19B**). Miševi Wt(Tlr2-luc) su, kao i na ipsilateralnoj hemisferi, imali veći bioluminiscentni signal ( $P = 0.011$ ) na kontralateralnoj hemisferi u odnosu na soj Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) (**Slika 19B**). Ovi rezultati su pokazali da nakon ishemijske lezije mišjeg mozga dolazi do aktivacije promotora gena *Tlr2* na ipsilateralnoj i na kontralateralnoj hemisferi bez obzira što je ishemijska lezija bila prisutna samo na ipsilateralnoj hemisferi. Nedostatak proteina TLR2 smanjio je upalni odgovor posredovan genom *Tlr2* na obje hemisfere.

Kako bi se uočile razlike u stopi smanjenja upalnih procesa na ipsilateralnoj i kontralateralnoj hemisferi, sve vrijednosti bioluminiscencije za pojedine hemisfere bile su prilagođene prema vrijednosti dobivenoj 2 dana nakon tMCAO. Kod miševa Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) bioluminiscencija je imala veći postotak smanjenja na ipsilateralnoj hemisferi u odnosu na soj Wt(Tlr2-luc) ( $P = 0.009$ ). Međutim, nije uočena razlika između sojeva za kontralateralnu hemisferu (**Slika 19C**). Ovi rezultati su pokazali da je nedostatak receptora TLR2 doveo do bržeg smanjenja upale posredovane genom *Tlr2* u akutnoj i sub-akutnoj fazi nakon moždanog udara na ipsilateralnoj hemisferi.

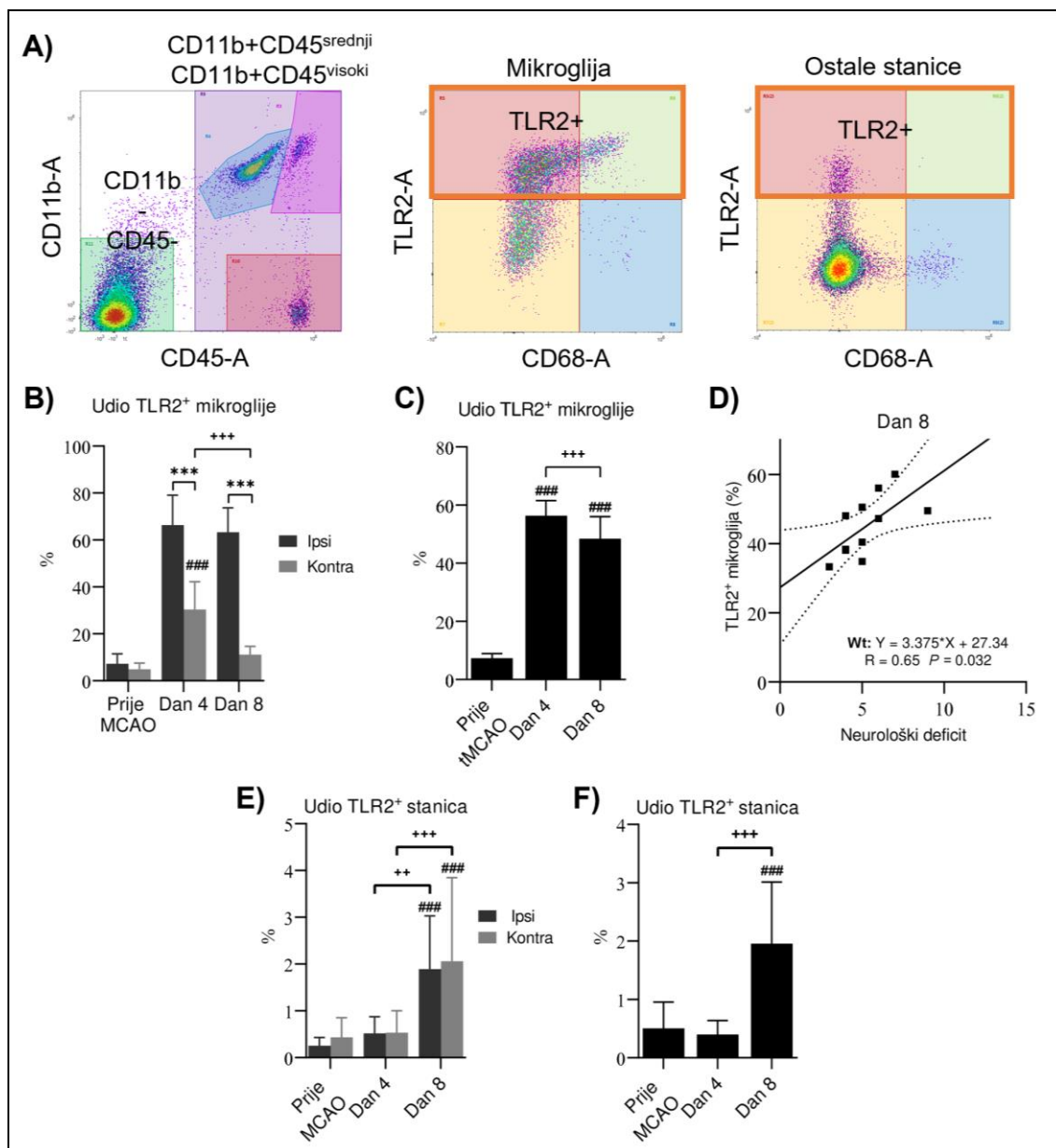


**Slika 19:** Rezultati *in vivo* bioluminiscencije miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2-/(Tlr2-luc) mjereni za svaku hemisferu zasebno. **A)** Reprezentativna slika bioluminiscencije mišjeg mozga 2 dana nakon tMCAO s postavljenim regijama od interesa koje prekrivaju zasebno ipsilateralnu i kontralateralnu hemisferu. **B)** Promjena protoka fotona tijekom 7 dana nakon tMCAO kod miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2-/(Tlr2-luc) izmjerena zasebno za svaku hemisferu. Povećanje bioluminiscencije nakon tMCAO vidljivo je na obje hemisfere. **C)** Postotak smanjenja bioluminiscencije u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara kod miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2-/(Tlr2-luc) izmjerena zasebno za svaku hemisferu. Uočen je veći postotak smanjenja bioluminiscencije kod miševa Tlr2-/(Tlr2-luc) u odnosu na Wt(Tlr2-luc). Sve apsolutne vrijednosti ukupnog protoka fotona su prilagođene prema vrijednosti dobivenoj 2 dana nakon tMCAO. \* - značajna razlika između sojeva; \* -  $P < 0.050$ , \*\* -  $P < 0.010$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ , dobiveno dvosmjernim ANOVA testom za ponovljena mjerenja i *post-hoc* analizom prema Sidaku.

### 5.3.3. Validacija povećanja izražaja receptora TLR2 nakon ishemijske ozljede metodom protočne citometrije

Kako bi se potvrdilo da je *in vivo* bioluminiscencija dobar molekularni biljeg izražaja receptora TLR2, metodom protočne citometrije je analiziran izražaj TLR2 prije ishemijske ozljede te 4 i 8 dana nakon tMCAO kod miševa Wt(Tlr2-luc). Nakon moždanog udara najveći izražaj receptora TLR2 prisutan je na stanicama mikroglije i makrofaga (80), stoga su te populacije stanica razdvojene u uzorcima izoliranih mozгова protočnim citometrom. Stanice mikroglije su razdvojene na protočnom citometru primjenom antitijela specifičnih za proteine CD11b i CD45, koji se nalaze na staničnoj membrani. Kombiniranjem ovih antitijela su definirane dvije populacije stanica: populacija mirujuće mikroglije bila je definirana kao CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>srednji</sup>, dok je populacija CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>visoki</sup> obuhvaćala aktiviranu mikrogliju i makrofage. Nakon razvrstavanja ovih populacija, određen je izražaj receptora TLR2 na svakoj populaciji zasebno. Izražaj receptora TLR2 bio je detektiran na populaciji mirujuće mikroglije kao i na populaciji aktivirane mikroglije i makrofaga pa su rezultati prikazani kao udio ukupnih stanica mikroglije (mirujuće i aktivirane) pozitivnih na izražaj receptora TLR2.

S obzirom da su prilikom pripreme uzoraka za protočnu citometriju razdvojene hemisfere, najprije je gledan udio TLR2<sup>+</sup> mikroglije za svaku hemisferu zasebno. Povećanje udjela TLR2<sup>+</sup> mikroglije nakon tMCAO uočeno je na ipsilateralnoj i kontralateralnoj hemisferi u obje promatrane vremenske točke nakon moždanog udara. Ipsilateralna hemisfera imala je značajno veći udio TLR2<sup>+</sup> mikroglije na dane 4 ( $71.75 \pm 5.77\%$  za ipsi,  $33.86 \pm 13.60\%$  za kontra;  $P < 0.001$ ) i 8 ( $69.46 \pm 6.94\%$  za ipsi,  $17.07 \pm 4.98\%$  za kontra;  $P < 0.001$ ) nakon tMCAO (**Slika 20B**). Na ipsilateralnoj hemisferi udio mikroglije koja izražava receptor TLR2 nije se značajno smanjio između 4. i 8. dana nakon tMCAO ( $P = 0.995$ ), ali uočeno je značajno smanjenje na kontralateralnoj hemisferi ( $P < 0.001$ ) (**Slika 20B**). Zatim je analiziran udio TLR2<sup>+</sup> mikroglije u cijelom mozgu. Prije izazivanja ishemijske ozljede mozga  $7.40 \pm 1.57\%$  stanica mikroglije u cijelom mozgu je izražavalo receptor TLR2 (**Slika 20C**). Nakon ishemijske ozljede došlo je do značajnog povećanja udjela TLR2<sup>+</sup> mikroglije. Najveći udio TLR2<sup>+</sup> mikroglije uočeno je 4 dana nakon moždanog udara ( $56.37 \pm 5.15\%$ ) te se značajno smanjio do 8. dana ( $48.40 \pm 7.64\%$ ;  $P < 0.001$ ) (**Slika 20C**). Ipak, 8 dana nakon moždanog udara udio TLR2<sup>+</sup> mikroglije ostao je značajno povišen u odnosu na bazalne vrijednosti ( $P < 0.001$ ). Ovim rezultatima potvrđeno je povećanje izražaja receptora TLR2 nakon moždanog udara kod miševa Wt(Tlr2-luc).



**Slika 20:** Rezultati protočne citometrije za analizu izražaja receptora TLR2 na stanicama mikroglije te na ostalim (ne-mijeloidnim i ne-imunosnim) stanicama središnjeg živčanog sustava. **A)** Reprezentativni prikaz strategije razvrstavanja stanica na protočnoj citometriji. Izražaj receptora TLR2 analiziran je na sveukupnoj mikrogliji, uključujući populaciju mirujuće (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>srednji</sup>) i aktivirane mikroglije/makrofaga (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>visoki</sup>), te na ne-mijeloidnim i ne-imunosnim stanicama mozga (CD11b<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>). **B)** Udio TLR2<sup>+</sup> mikroglije u hemisferama mozga miševa Wt(Tlr2-luc) prije i nakon tMCAO. **C)** Udio TLR2<sup>+</sup> mikroglije u cijelom mozgu miševa Wt(Tlr2-luc) prije i nakon tMCAO. **D)** Korelacija udjela mikroglije pozitivne na izražaj receptora TLR2 s neurološkim deficitom 8 dana nakon tMCAO kod miševa Wt(Tlr2-luc). Punom linijom je označen pravac linearne regresije, a isprekidane krivulje

označavaju 95%-tni interval pouzdanosti. Za korelaciju je napisana jednadžba pravca linearne regresije, Pearsonov koeficijent korelacije te statistička značajnost. **E)** Izražaj receptora TLR2 na ostalim stanicama središnjeg živčanog sustava prikazan za svaku hemisferu zasebno. **F)** Udio ostalih stanica cijelog mozga pozitivnih na receptor TLR2 kod miševa Wt(Tlr2-luc) prije i nakon tMCAO. # - značajno u odnosu na bazalne vrijednosti, \* - značajna razlika između hemisfera, + - značajna razlika između vremenskih točaka; #\*/+ -  $P < 0.050$ , ##/\*\*/++ -  $P < 0.010$ , ###/\*\*\*/+++ -  $P < 0.001$ , dobiveno jednosmjernim (**C** i **F**) i dvosmjernim (**B** i **E**) ANOVA testom za neponovljena mjerenja uz *post-hoc* analizu prema Tukey-u.

Kako bi se pokazao utjecaj receptora TLR2 na funkcionalni ishod nakon moždanog udara udio TLR2<sup>+</sup> mikroglije u cijelom mozgu je koreliran s neurološkim deficitom. Značajna pozitivna korelacija uočena je isključivo za vrijednosti dobivene u sub-akutnoj fazi moždanog udara, 8 dana nakon tMCAO ( $R = 0.65$ ,  $P = 0.032$ ), dok u akutnoj fazi (4 dana nakon tMCAO) korelacija nije bila značajna (**Slika 20D**). Ovakav rezultat bi ponovno ukazivao na štetnu ulogu receptora TLR2 u funkcionalnom oporavku miševa nakon moždanog udara.

Iako je, osim na stanicama mikroglije i makrofaga, izražaj *Tlr2* pronađen i u astrocitima i oligodendrocitima, pokazalo se kako ove stanice imaju daleko manji izražaj mRNA gena *Tlr2* u odnosu na mikrogliju i makrofage (73). S obzirom da protočna citometrija ima veću osjetljivost u odnosu na imunohistokemiju, bilo je omogućeno detektirati male količine receptora TLR2 izražene na stanicama središnjeg živčanog sustava koje ne pripadaju mijeloidnoj niti leukocitnoj liniji. Te stanice bile su definirane kao CD11b<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> populacija, a obuhvaća astrocite, oligodendrocite, neurone i endotelne stanice. Međutim, prema podacima u literaturi receptor TLR2 nije izražen na zrelim neuronima u mozgu odraslih životinja (74). Rezultati protočne citometrije prikazani su kao udio stanica CD11b<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> koje su pozitivne na receptor TLR2 (**Slika 20A**). Prije izazivanja moždanog udara bio je prisutan minimalni udio stanica pozitivnih na receptor TLR2 ( $0.50 \pm 0.45\%$ ) (**Slika 20F**). Ovo je mnogo manji izražaj u odnosu na udio TLR2<sup>+</sup> mikroglije ( $7.40 \pm 1.57\%$ ) što je bilo u skladu s već opisanim podacima iz literature. Nakon izazivanja ishemijske lezije značajno povećanje ( $P < 0.001$ ) izražaja receptora TLR2 na ostalim stanicama središnjeg živčanog sustava uočeno je tek 8 dana nakon tMCAO kada je  $1.96 \pm 1.06\%$  stanica bilo pozitivno na receptor TLR2 (**Slika 20F**). Gledajući rezultate po hemisferama povećanje izražaja receptora TLR2 na dan 8 je bilo podjednako na obje hemisfere mozga ( $1.89 \pm 1.14\%$  za ipsi,  $2.06 \pm 1.79\%$  za kontra;  $P > 0.999$ ) (**Slika 20E**).

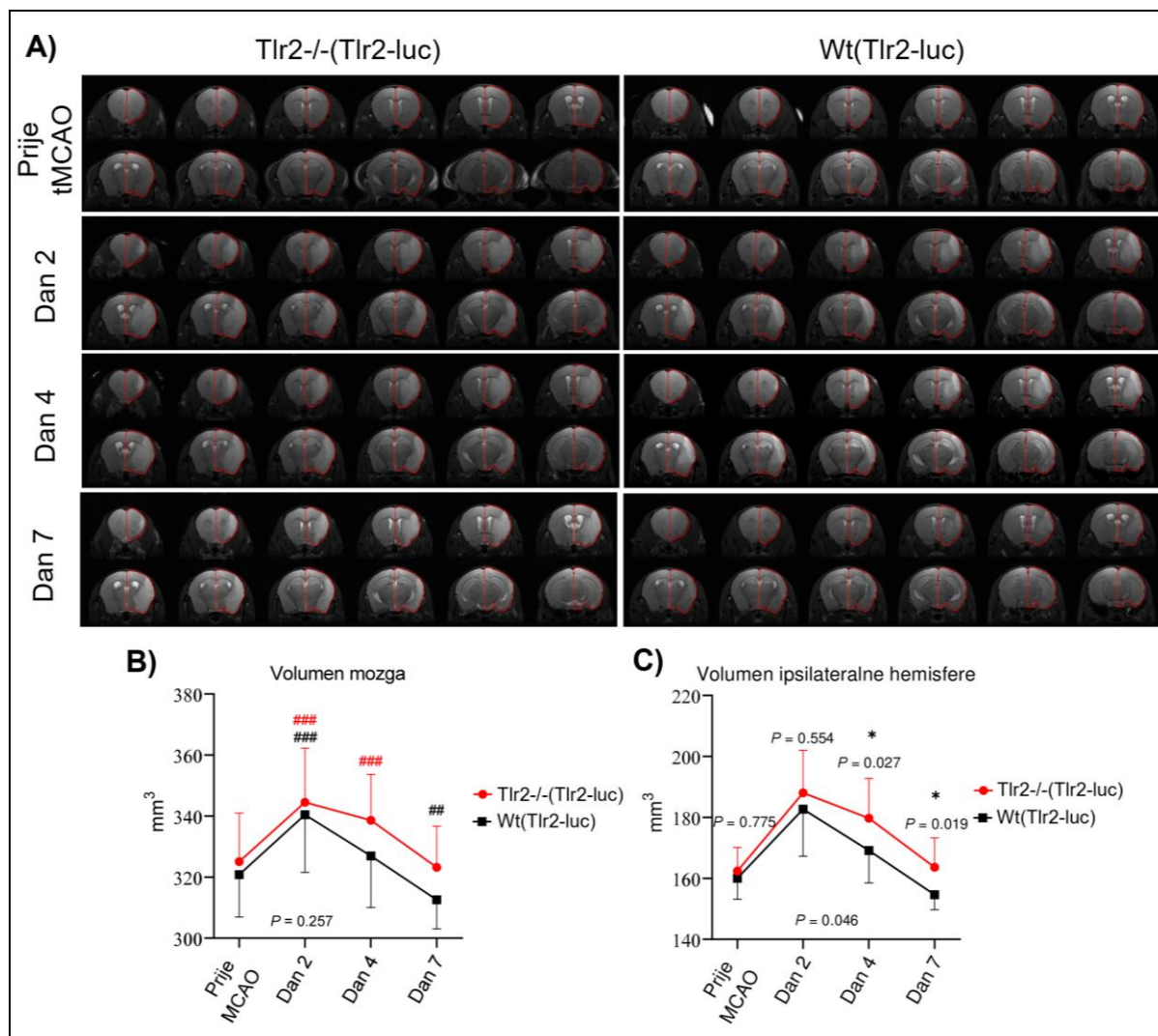
Ovakvi rezultati su ukazali da uz mikrogliju i ostale stanice središnjeg živčanog sustava doprinose intenzitetu bioluminiscencije posredovane receptorom TLR2 nakon moždanog udara. Međutim, ove stanice su imale znatno manji izražaj receptora TLR2 te promijenjenu vremensku dinamiku aktivacije izražaja u odnosu na mikrogliju.

## 5.4. Nedostatak receptora TLR2 dovodi do razvoja veće ishemijske lezije u akutnoj fazi, ali i do bržeg funkcionalnog oporavka

### 5.4.1. Miševi Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) imaju veću ishemijsku leziju i izraženiji edem

Kako bi se odredila uloga receptora TLR2 u razvoju ishemijske lezije volumen mozga i ishemijske lezije miševi su longitudinalno praćeni snimanjem magnetske rezonancije tijekom 7 dana nakon tMCAO zahvata (**Slika 21A**). Najprije su gledane razlike u ukupnom volumenu mozga te u volumenu pojedinih hemisfera kod mišjih linija Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc). Volumetrijska analiza T2 ponderiranih snimki pokazala je nešto veći ukupni volumen mozga nakon tMCAO kod miševa Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) u odnosu na Wt(Tlr2-luc), međutim ova razlika nije bila statistički značajna ( $P = 0.257$ ). Uočena je različita dinamika promjene ukupnog volumena moždanog udara kod pojedinih sojeva. Dva dana nakon moždanog udara oba soja su imala značajno veći ukupni volumen mozga u odnosu na bazalne vrijednosti ( $P < 0.001$  za oba soja). Povećanje ukupnog volumena mozga u akutnoj fazi moždanog udara bilo je posljedica vazogenog edema. Kod miševa divljeg tipa ukupni volumen mozga vratio se na bazalnu vrijednost ( $320.80 \pm 13.90 \text{ mm}^3$ ) do 4. dana ( $326.90 \pm 16.93 \text{ mm}^3$ ) nakon tMCAO, a 7. dan ( $312.60 \pm 9.53 \text{ mm}^3$ ) je uočen značajni gubitak ( $P = 0.002$ ) volumena tkiva u odnosu na vrijednost prije tMCAO (**Slika 21B**). Miševi s nedostatkom receptora TLR2 imali su promijenjenu dinamiku promjene volumena mozga u odnosu na miševe divljeg tipa. Ukupni volumen mozga bio je značajno veći 2 ( $344.50 \pm 17.73 \text{ mm}^3$ ,  $P < 0.001$ ) i 4 dana nakon tMCAO ( $338.60 \pm 15.03 \text{ mm}^3$ ,  $P < 0.001$ ) u odnosu na početne vrijednosti ( $325.00 \pm 15.91 \text{ mm}^3$ ), a 7. dan ( $323.20 \pm 13.47 \text{ mm}^3$ ) bio je usporediv s bazalnim vrijednostima (**Slika 21B**). Nije uočeno značajno smanjenje ( $P > 0.999$ ) volumena mozga 7. dan kao kod miševa divljeg tipa. Prema ovim podacima inhibicija receptora TLR2 rezultirala je odgodom gubitka tkiva u akutnoj fazi moždanog udara. Zatim je gledana promjena volumena ipsilateralne (lijeve) hemisfere mozga na kojoj se nalazila ishemijska lezija. Volumen ipsilateralne hemisfere se povećao nakon moždanog udara kod oba soja, slično kao i ukupni volumen mozga. Prije izazivanja moždanog udara nije bila prisutna razlika u volumenu ipsilateralne hemisfere između miševa Wt(Tlr2-luc) ( $160.00 \pm 6.89 \text{ mm}^3$ ) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) ( $162.40 \pm 7.76 \text{ mm}^3$ ), međutim 4 i 7 dana nakon moždanog udara miševi Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) (dan 4:  $188.00 \pm 13.92 \text{ mm}^3$ ; dan 7:  $179.70 \pm 13.07 \text{ mm}^3$ ) su imali značajno veći (dan 4:  $P = 0.027$ ; dan 7:  $P = 0.019$ ) volumen ipsilateralne hemisfere mozga u odnosu na miševe Wt(Tlr2-luc) (dan 4:  $171.20 \pm 13.91 \text{ mm}^3$ ; dan 7:  $154.60 \pm 4.95 \text{ mm}^3$ ) (**Slika 21C**). Ovakve razlike u volumenu ipsilateralne hemisfere su upućivale na

postojanje razlika u intenzitetu edema nakon moždanog udara kod miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2-<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc).



**Slika 21:** Rezultati volumetrijske analize T2 ponderiranih snimki. **A)** Reprezentativne T2 ponderirane snimke promjene volumena ipsilateralne hemisfere (ocrtano crvenom linijom) tijekom 7 dana nakon tMCAO kod miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc). **B)** Promjena ukupnog volumena mozga u ovisnosti o vremenu nakon tMCAO kod sojeva Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) i Wt(Tlr2-luc). **C)** Promjena volumena ipsilateralne hemisfere u ovisnosti o vremenu proteklom nakon izazivanja ishemijske. Nedostatak receptora TLR2 odgodio je gubitak tkiva mozga u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara. # - značajno u odnosu na bazalne vrijednosti, \* - značajna razlika između sojeva; #/\* - *P* < 0.050, ##/\*\* - *P* < 0.010, ###/\*\*\* - *P* < 0.001,

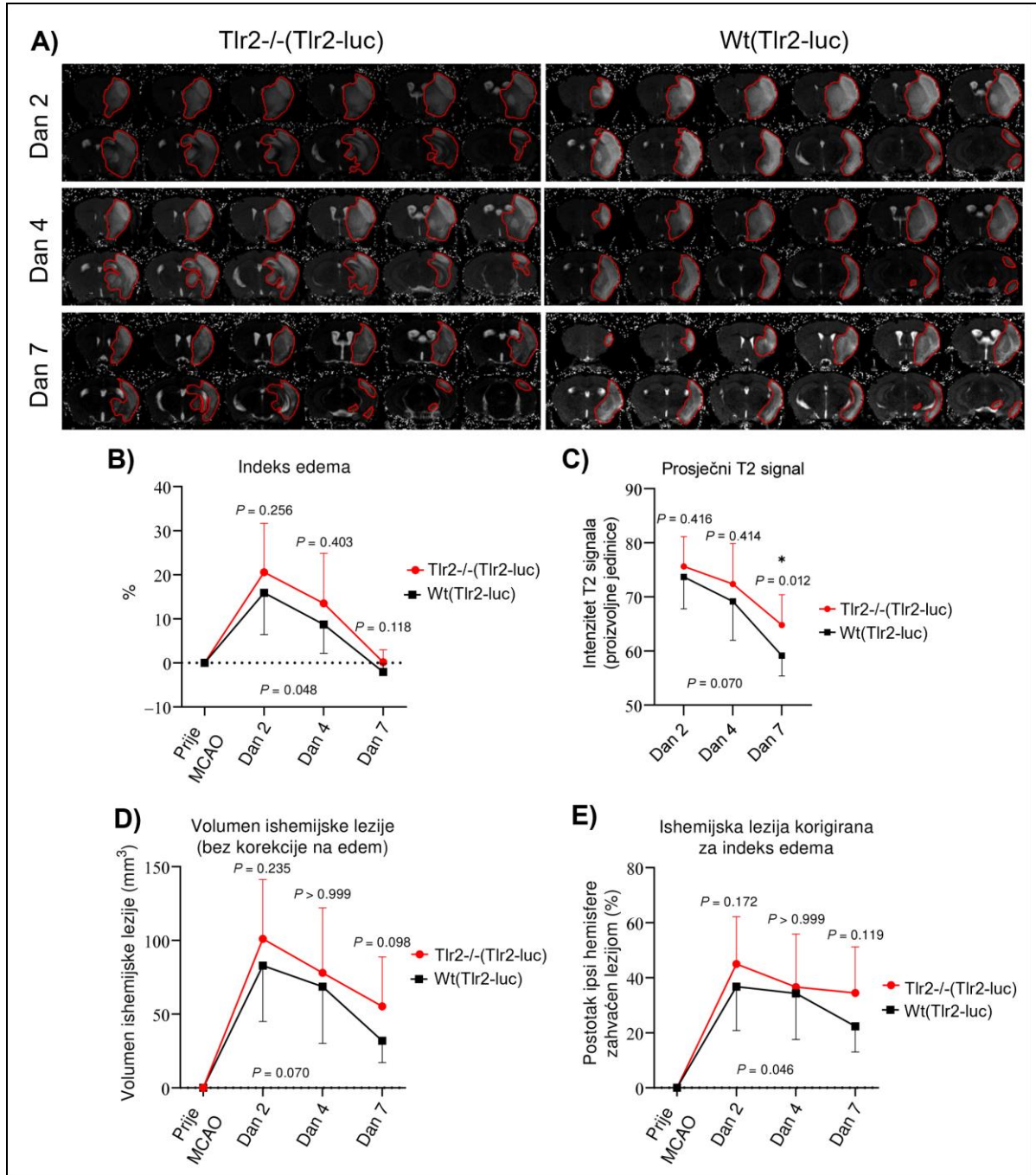


izračunato dvosmjernim ANOVA testom za ponovljena mjerenja i *post hoc* analizom prema Sidaku (#) te prema Tukey-u (\*).

U akutnoj fazi moždanog udara hiperintenzivni signal na T2 ponderiranim snimkama je posljedica ishemijske lezije i vazogenog edema te se ova dva procesa ne mogu razlučiti na ovim snimkama (**Slika 22A**), međutim njihovi zasebni efekti se mogu odvojiti korištenjem matematičkih formula (133). Kod oba soja indeks edema bio je najveći 2 dana (Wt(Tlr2-luc):  $15.91 \pm 9.51\%$ ; Tlr2-/(Tlr2-luc):  $20.58 \pm 11.07\%$ ) nakon tMCAO, te se smanjio na bazalne vrijednosti do dana 7 (**Slika 22B**). Gledajući sveukupni učinak kroz tri vremenske točke nakon tMCAO, miševi s TLR2 deficijencijom imali su značajno veći ( $P = 0.048$ ) edem u odnosu na miševe divljeg tipa, međutim nije uočena značajna razlika u pojedinim vremenskim točkama između sojeva. Kako bi se upotpunili rezultati računanja edema mozga nakon moždanog udara, određen je prosječni T2 signal u području ishemijske lezije koji predstavlja indirektnu mjeru količine vode tkivu. Dinamika prosječnog T2 signala pratila je dinamiku edema. Najveći signal zabilježen je 2 dana nakon tMCAO (Wt(Tlr2-luc):  $73.68 \pm 5.89$ , Tlr2-/(Tlr2-luc):  $75.36 \pm 5.50$ ) te se postepeno smanjio do dana 7 (**Slika 22C**). Razlika između sojeva uočena je 7 dana nakon tMCAO kada su miševi Tlr2-/(Tlr2-luc) imali značajno veći prosječni T2 signal u području ishemijske lezije u odnosu na Wt(Tlr2-luc) (Wt(Tlr2-luc):  $59.14 \pm 3.76$ , Tlr2-/(Tlr2-luc):  $64.79 \pm 5.59$ ,  $P = 0.012$ ).

Volumen ishemijske lezije najprije je prikazan kao volumen hiperintenzivnog signala ocrtanog na T2 mapi. Vremenska dinamika promjene volumena ishemijske lezije također je pratila dinamiku edema. Najveći volumen lezije je zabilježena 2 dana nakon tMCAO (Wt(Tlr2-luc):  $82.91 \pm 37.91 \text{ mm}^3$ ; Tlr2-/(Tlr2-luc):  $101.02 \pm 40.21 \text{ mm}^3$ ) te se postepeno smanjio do dana 7 (Wt(Tlr2-luc):  $31.90 \pm 14.79 \text{ mm}^3$ ; Tlr2-/(Tlr2-luc):  $55.27 \pm 33.58 \text{ mm}^3$ ) (**Slika 22D**). Međutim, nije uočena značajna razlika između sojeva ( $P = 0.070$ ). S obzirom na pokazane razlike u edemu, volumen ishemijske lezije prilagođen je prema indeksu edema te prikazan kao postotak volumena ipsilateralne hemisfere zahvaćen lezijom. Vremenska dinamika razvoja ishemijske lezije odgovarala je promjeni volumena hiperintenzivnog signala koja je prethodno opisana. Najveća ishemijska lezija bila je prisutna 2 dana nakon moždanog udara (Wt(Tlr2-luc):  $36.76 \pm 15.96\%$ ; Tlr2-/(Tlr2-luc):  $45.00 \pm 17.16\%$ ), smanjila se do dana 7 (Wt(Tlr2-luc):  $22.34 \pm 9.37\%$ ; Tlr2-/(Tlr2-luc):  $34.43 \pm 16.77\%$ ), međutim lezija nije u potpunosti nestala (**Slika 22E**). Nije uočena statistički značajna razlika u veličini ishemijske lezije u pojedinim

vremenskim točkama između miševa *Wt(Tlr2-luc)* i *Tlr2-/(Tlr2-luc)*, ali gledajući sveukupni efekt miševi *Tlr2-/(Tlr2-luc)* su imali veću ishemijsku leziju ( $P = 0.046$ ).



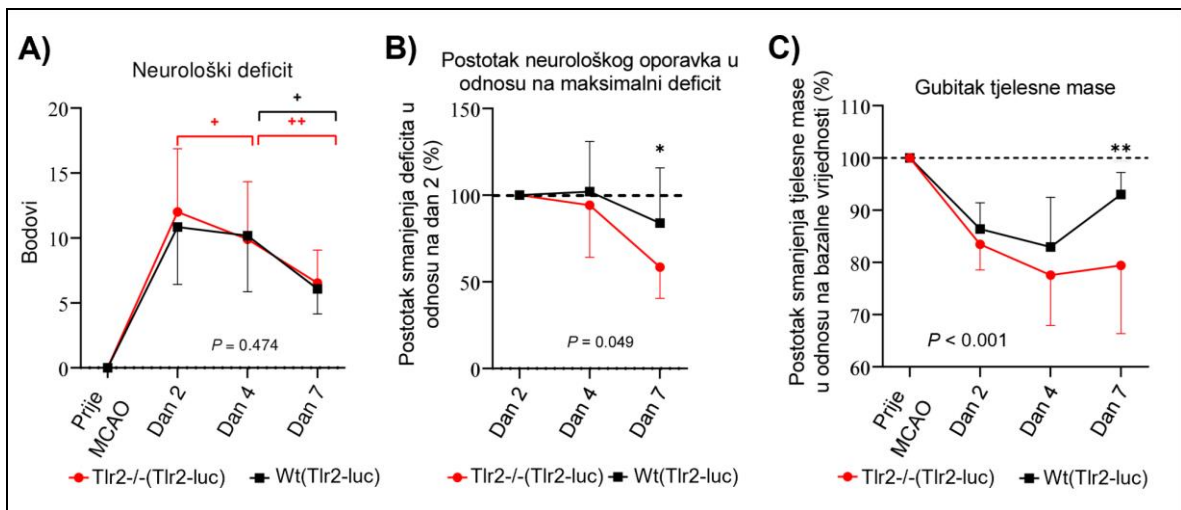
**Slika 22:** Rezultati volumetrijske analize veličine ishemijske lezije na T2 mapama mišjih mozгова. **A)** Reprezentativne T2 mape evolucije ishemijske lezije (ocrtano crvenom linijom) tijekom 7 dana nakon tMCAO kod miševa *Tlr2-/(Tlr2-luc)* i *Wt(Tlr2-luc)*. **B)** Promjena indeksa edema tijekom 7 dana nakon tMCAO kod miševa *Tlr2-/(Tlr2-luc)* i *Wt(Tlr2-luc)*. **C)**

Prosječni T2 signal izračunat za T2 mape u području ishemijske lezije. Ova vrijednost predstavlja indirektnu mjeru količine vode u tkivu zahvaćenom ishemijskom lezijom. **D)** Promjena volumena ishemijske lezije (izraženog u mm<sup>3</sup>) bez korekcije na edem kod sojeva Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) i Wt(Tlr2-luc). **E)** Volumen ishemijske lezije prilagođen prema indeksu edema te prikazan kao postotak ipsilateralne hemisfere zahvaćen lezijom. Miševi s onemogućenim receptorom TLR2 su imali veći edem i leziju u odnosu na miševe Wt(Tlr2-luc). \* - razlika između sojeva; \* -  $P < 0.050$ ; \*\* -  $P < 0.010$ ; \*\*\* -  $P < 0.001$ , dobiveno dvosmjernim ANOVA testom za ponovljena mjerenja te *post-hoc* analizom prema Sidaku.

Ovi rezultati su pokazali da je nedostatak receptora TLR2 doveo do formiranja veće ishemijske lezije i do izraženijeg edema u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara. Edem i ishemijska lezija bili su najveći 2 dana nakon tMCAO kod oba soja te su postepeno smanjeni do dana 7. Također, promijenila se vremenska dinamika trajanja edema. Kod miševa Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) edem se razriješio kasnije u odnosu na Wt(Tlr2-luc) što je u konačnici rezultirao kasnijim početkom gubitka ukupnog volumena tkiva mozga nakon moždanog udara.

#### **5.4.2. Brži funkcionalni oporavak miševa Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) nakon ishemijskog oštećenja mozga**

Uz volumen ishemijske lezije testovi procjene neurološkog deficita i funkcionalnog oporavka životinja su važni alati za procjenu ishoda moždanog udara u pretkliničkim studijama. Analizom rezultata procjene neurološkog deficita pokazano je da nema razlike u apsolutnim vrijednostima neurološkog deficita između miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) ( $P = 0.474$ ) (**Slika 23A**). Oba soja imala su sličan obrazac promjene neurološkog deficita, najveći neurološki deficit uočen je 2 dana nakon tMCAO zahvata, a smanjio se do dana 7 (**Slika 23A**). Ovakav obrazac promjene neurološkog deficita pratio je promjene u volumenu ishemijske lezije. Međutim, uočene su razlike u vremenskoj dinamici smanjenja neurološkog deficita između sojeva. Kod miševa Wt(Tlr2-luc) značajno smanjenje ( $P = 0.013$ ) neurološkog deficita uočeno je između dana 4 ( $10.17 \pm 4.31$  bodova) i 7 ( $6.08 \pm 1.94$  bodova) nakon tMCAO, dok se kod miševa Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) neurološki deficit značajno smanjio ( $P = 0.048$ ) već između dana 2 ( $12.00 \pm 4.87$  bodova) i 4 ( $9.90 \pm 4.45$  bodova) nakon tMCAO (**Slika 23A**).



**Slika 23:** Rezultati procjene neurološkog deficita i gubitka tjelesne mase nakon tMCAO. **A)** Promjena apsolutne vrijednosti neurološkog deficita u ovisnosti o vremenu nakon tMCAO. **B)** Postotak smanjenja neurološkog oštećenja u odnosu na maksimalni deficit izmjeren 2 dana nakon tMCAO. Kako bi se izračunao postotak smanjenja neurološkog oštećenja, sve vrijednosti neurološkog deficita izmjerene u kasnijim vremenskim točkama (na dane 4 i 7) su prilagođene prema vrijednostima dobivenim 2 dana nakon tMCAO. **C)** Gubitak tjelesne mase kod miševa Tlr2-/- (Tlr2-luc) i Wt(Tlr2-luc) u ovisnosti o vremenu nakon tMCAO. Tjelesna masa u vremenskim točkama nakon tMCAO prikazana je kao postotak u odnosu na bazalne vrijednosti. Miševi s nedostatkom receptora TLR2 su imali bolju stopu neurološkog oporavka u odnosu na miševe divljeg tipa. \* - razlika između sojeva, + - razlika između vremenskih točaka; \*/+ -  $P < 0.050$ ; \*\*/+ -  $P < 0.010$ ; \*\*\*/+++ -  $P < 0.001$ , dobiveno dvosmjernim ANOVA testom za ponovljena mjerenja uz *post-hoc* analizu prema Sidaku (\*) ili prema Tukey-u (+).

Kako bi se odredilo koji sve parametri oštećenja moduliraju neurološko oštećenje nakon ishemijske ozljede, korišteno je statističko modeliranje logističkom regresijom za kategoričke varijable. Model je testirao utjecaj nedostatka receptora TLR2, vremena nakon tMCAO, volumena ishemijske lezije te intenziteta bioluminiscencije na neurološko oštećenje. Gledajući sveukupni model, pseudo  $R^2$  je iznosio 0.524 ( $P < 0.001$ ) čime je objašnjeno 52.4% varijance neurološkog deficita, a statistički značajni utjecaj na neurološki deficit su pokazali vrijeme nakon tMCAO ( $B = -0.220$ ,  $P = 0.011$ ), volumen lezije ( $B = 0.063$ ,  $P < 0.001$ ) i bioluminiscencija ( $B = 2.47 \times 10^{-8}$ ,  $P = 0.022$ ), dok utjecaj nedostatka receptora TLR2 nije bio statistički značajan ( $B = 0.344$ ,  $P = 0.262$ ). Negativna korelacija neurološkog deficita s vremenom nakon tMCAO i njezin nedostatak s alokacijom životinja prema soju (tj. s

nedostatkom receptora TLR2) bili su u skladu s rezultatima ANOVA testa. S druge strane, pozitivna korelacija neurološkog deficita s intenzitetom bioluminiscencije upućivala je na poveznicu između upale posredovane receptorom TLR2 i neurološkog deficita nakon tMCAO.

Longitudinalni dizajn studije nam je uz procjenu funkcionalnog oštećenja omogućio i praćenje oporavka određivanjem dinamike/postotka smanjenja deficita između uzastopnih vremenskih točaka. U tu svrhu postotak smanjenja neurološkog oštećenja prikazan je kao udio deficita u odnosu na vrijednosti dobivene 2 dana nakon tMCAO, kada je bio prisutan najveći deficit. Rezultati su pokazali da miševi Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) imaju veći postotak smanjenja neurološkog oštećenja u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara u odnosu na miševe divljeg tipa ( $P = 0.042$ ), a najveća razlika između sojeva je uočena 7 dana nakon tMCAO ( $58.50 \pm 18.03\%$  za Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) i  $83.91 \pm 31.87\%$  za Wt(Tlr2-luc);  $P = 0.049$ ) (**Slika 23B**).

Nadalje, statističkim modeliranjem pomoću višestruke linearne regresije testirano je koji parametri oštećenja moduliraju postotak smanjenja neurološkog oštećenja. Testiran je utjecaj nedostatka receptora TLR2, vremena nakon tMCAO, volumena ishemijske lezije, bioluminiscencije i postotka smanjenja bioluminiscencije. Sveukupni model je predvidio 25.4% varijance u stopi smanjenja neurološkog deficita. Nedostatak receptora TLR2 i vrijeme nakon tMCAO objasnili su 5.3% ( $P = 0.007$ ) i 18.1% ( $P < 0.001$ ) varijance, dok uključivanje volumena ishemijske lezije (0.2%,  $P = 0.586$ ), intenziteta bioluminiscencije (1.5%,  $P = 0.103$ ) i postotka smanjenja bioluminiscencije (0.2%,  $P = 0.516$ ) nije značajno povećalo prediktivnu vrijednost modela. Međutim, gledajući pojedinačni učinak, sve varijable, osim volumena ishemijske lezije, pokazale su značajnu korelaciju sa stopom smanjenja neurološkog deficita. Nedostatak receptora TLR2 ( $R = -0.231$ ,  $P = 0.003$ ) i vrijeme nakon tMCAO ( $R = -0.426$ ,  $P < 0.001$ ) imali su negativni Pearsonov koeficijent korelacije, ukazujući da su Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) miševi imali veći postotak smanjenja neurološkog oštećenja koja se povećavala tijekom vremena, što je bilo u skladu s rezultatima ANOVA testa. Nadalje, volumen ishemijske lezije ( $R = 0.114$ ,  $P = 0.088$ ), bioluminiscencija ( $R = 0.302$ ,  $P < 0.001$ ) i postotak smanjenja bioluminiscencije ( $R = 0.382$ ,  $P < 0.001$ ) su imali pozitivni Pearsonov koeficijent korelacije, ukazujući da miševi s većom ishemijskom lezijom i većim intenzitetom upale posredovane receptorom TLR2 imaju sporiji neurološki oporavak nakon tMCAO.

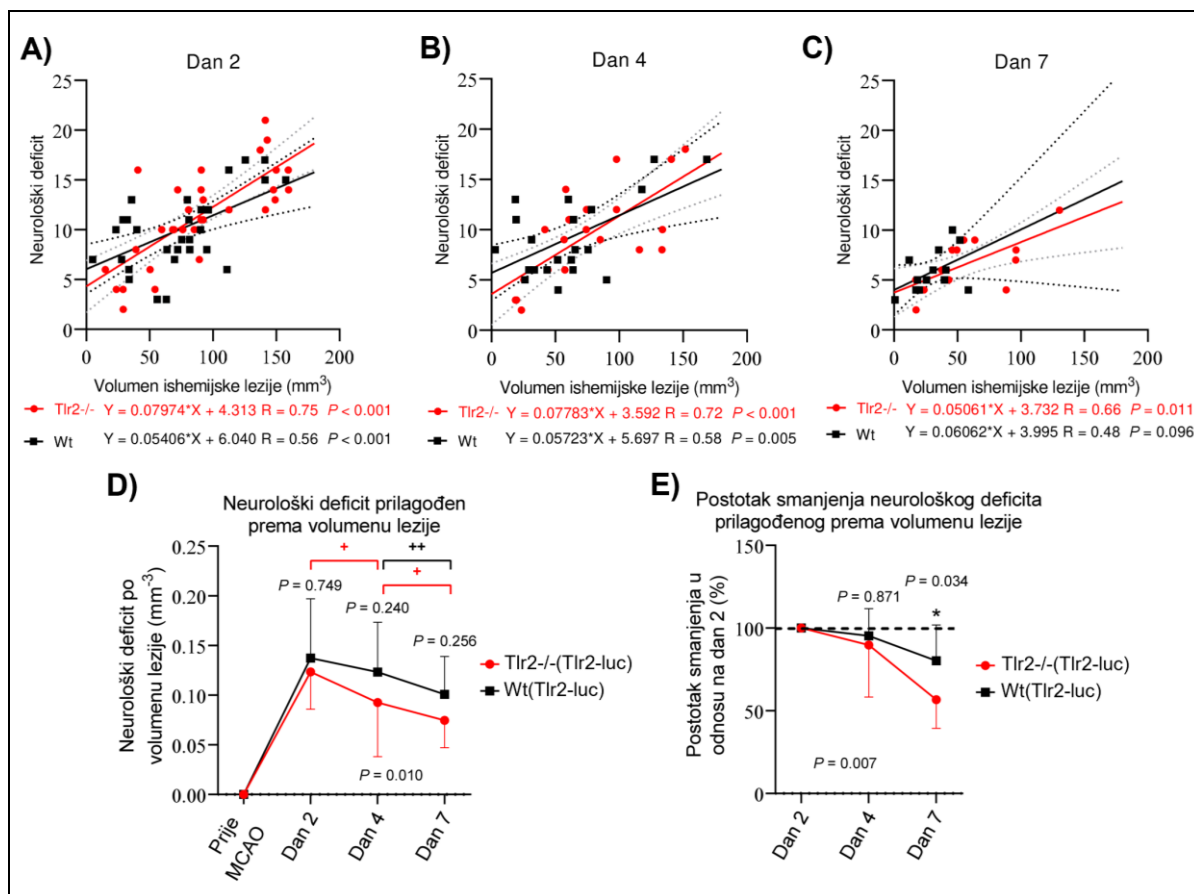
Procjena gubitka tjelesne mase još je jedan važan pokazatelj zdravstvenog stanja i funkcionalnog oporavka životinja. Suprotno očekivanjima, dinamika gubitka tjelesne mase nije pratila trend neurološkog deficita. Kod oba soja najveći gubitak tjelesne mase u odnosu na

bazalne vrijednosti uočen je 4 dana nakon moždanog udara, a životinje su vratile dio izgubljene mase do dana 7 nakon tMCAO (**Slika 23C**). Miševi soja Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) imali su značajno veći gubitak tjelesne mase u odnosu na miševe divljeg tipa ( $P < 0.001$ ), a najveća razlika je uočena 7 dana nakon tMCAO ( $79.40 \pm 13.03\%$  za Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) i  $93.00 \pm 4.22\%$  za Wt(Tlr2-luc);  $P = 0.005$ ) (**Slika 23C**).

#### 5.4.3. Korelacija volumena ishemijske lezije i neurološkog deficita

Neurološki deficit i volumen ishemijske lezije su imali sličnu vremensku dinamiku, također logistička regresija je pokazala značajnu poveznicu između volumena ishemijske lezije i neurološkog deficita. Kako bi se dodatno okarakterizirala ovisnost neurološkog deficita o volumenu ishemijske lezije, izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije zasebno za oba soja te za sve vremenske točke.

Dobivena je pozitivna korelacije volumena ishemijske lezije i neurološkog deficita u sve tri vremenske točke nakon tMCAO. Porastom volumena ishemijske lezije povećao se neurološki deficit. Korelacija je uočena neovisno o prisutnosti receptora TLR2. Miševi bez funkcionalnog receptora TLR2 su 2 dana ( $R = 0.75$ ,  $P < 0.001$ ) i 4 dana ( $R = 0.72$ ,  $P < 0.001$ ) nakon moždanog udara imali visoki Pearsonov koeficijent korelacije, dok je na dan 7 bio prisutan umjereni koeficijent korelacije ( $R = 0.66$ ,  $P = 0.011$ ) (**Slika 24**). Za razliku od njih, miševi Wt(Tlr2-luc) su imali umjereni Pearsonov koeficijent korelacije 2 dana ( $R = 0.56$ ,  $P < 0.001$ ) i 4 dana ( $R = 0.58$ ,  $P = 0.005$ ) nakon tMCAO, dok na dan 7 ( $R = 0.48$ ,  $P = 0.096$ ) korelacija nije bila značajna (**Slika 24**). Ovi rezultati pokazuju da se primijenjeni protokol procjene neurološkog deficita pokazao kao dobar prediktor volumena ishemijske lezije u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara.



**Slika 24:** Korelacija između volumena ishemijske lezije (izražene u mm<sup>3</sup>) i neurološkog deficita 2 (A), 4 (B) i 7 (C) dana nakon tMCAO kod miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc). Za svaku vremensku točku i soj je napisana jednačba pravca linearne regresije, Pearsonov koeficijent korelacije te statistička značajnost korelacije. Punim crtama označeni su pravci linearne regresije, dok isprekidane krivulje predstavljaju 95%-tne intervale pouzdanosti. D) Neurološki deficit prilagođen prema volumenu ishemijske lezije izmjenom 2 dana nakon tMCAO kod miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc). Vidljivo je kako miševi s nedostatkom receptora TLR2 imaju značajno manji neurološki deficit prilagođen prema volumenu lezije u odnosu na miševe Wt(Tlr2-luc). E) Postotak smanjenja neurološkog deficita prilagođenog prema volumenu ishemijske lezije u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara kod miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc). Postotak smanjenja izračunat je u odnosu na maksimalnu vrijednost dobivenu 2 dana nakon tMCAO. \* - razlika između sojeva, + - razlika između vremenskih točaka; \*/+ -  $P < 0.050$ ; \*\*/+ -  $P < 0.010$ ; \*\*\*/+++ -  $P < 0.001$ , dobiveno dvosmjernim ANOVA testom za ponovljena mjerenja uz *post-hoc* analizu prema Sidaku (\*) ili prema Tukey-u (+).

Temeljem rezultata korelacije i logističke regresije, neurološki deficit je prilagođen prema volumenu lezije dobivenom 2 dana nakon tMCAO. Cilj ovakvog prikaza bio je ustvrditi kako nedostatak receptora TLR2 utječe funkcionalno oštećenje prilagođeno na volumen ishemijske lezije. Gledajući sveukupni efekt, nedostatak receptora TLR2 doveo je do nastanka manjeg ( $P = 0.010$ ) prilagođenog neurološkog deficita po volumenu ishemijske lezije. Najveći neurološki deficit prilagođen prema veličini ishemijske lezije bio je prisutan 2 dana nakon tMCAO kod oba soja (Wt(Tlr2-luc):  $0.137 \pm 0.050 \text{ mm}^{-3}$ ; Tlr2-/(Tlr2-luc):  $0.123 \pm 0.038 \text{ mm}^{-3}$ ) te se smanjio do dana 7 (Wt(Tlr2-luc):  $0.101 \pm 0.038 \text{ mm}^{-3}$ ; Tlr2-/(Tlr2-luc):  $0.075 \pm 0.027 \text{ mm}^{-3}$ ) (**Slika 24D**). Nisu uočene statistički značajne razlike između sojeva za pojedine vremenske točke, međutim kod miševa Tlr2-/(Tlr2-luc) se neurološki deficit prilagođen prema volumenu lezije smanjio između dana 2 i 4 ( $P = 0.015$ ), dok je kod miševa Wt(Tlr2-luc) smanjenje uočeno tek između dana 4 i 7 ( $P = 0.009$ ) (**Slika 24D**). Kako bi se dodatno opisala uočena dinamika, izračunat je postotak smanjenja neurološkog deficita prilagođenog prema volumenu ishemijske lezije, dakle neurološki deficit prilagođen prema volumenu lezije izračunat u kasnijom vremenskim točkama izražen je kao postotak vrijednosti dobivenih 2 dana nakon tMCAO. U skladu s prethodnim opažanjima, miševi Tlr2-/(Tlr2-luc) su imali veći postotak smanjenja ( $P = 0.007$ ) neurološkog deficita prilagođenog prema volumenu ishemijske lezije u odnosu na Wt(Tlr2-luc) miševe, a najveća razlika je uočena 7 dana nakon tMCAO (Wt(Tlr2-luc):  $80.20 \pm 21.62\%$ , Tlr2-/(Tlr2-luc):  $56.71 \pm 17.39\%$ ;  $P = 0.034$ ) (**Slika 24E**). Ovakvi rezultati su pokazali da je nedostatak receptora TLR2 doveo do razvoja manjeg neurološkog deficita po volumenu ishemijske lezije te do bržeg smanjenja neurološkog oštećenja prilagođenog prema volumenu lezije u odnosu na miševe s funkcionalnim receptorom TLR2.

#### **5.4.4. Korelacija upale posredovane receptorom TLR2 s parametrima oštećenja mozga nakon moždanog udara**

S obzirom da je linearnom regresijom pokazana poveznica između volumena ishemijske lezije, neurološkog deficita i jačine upale mjerene metodom *in vivo* bioluminiscencije, napravljene su dodatne korelacije bioluminiscencije s ishemijskim oštećenjem. Korelacije su izračunate zasebno za oba soja te za sve 3 vremenske točke: 2, 4 i 7 dana nakon moždanog udara.

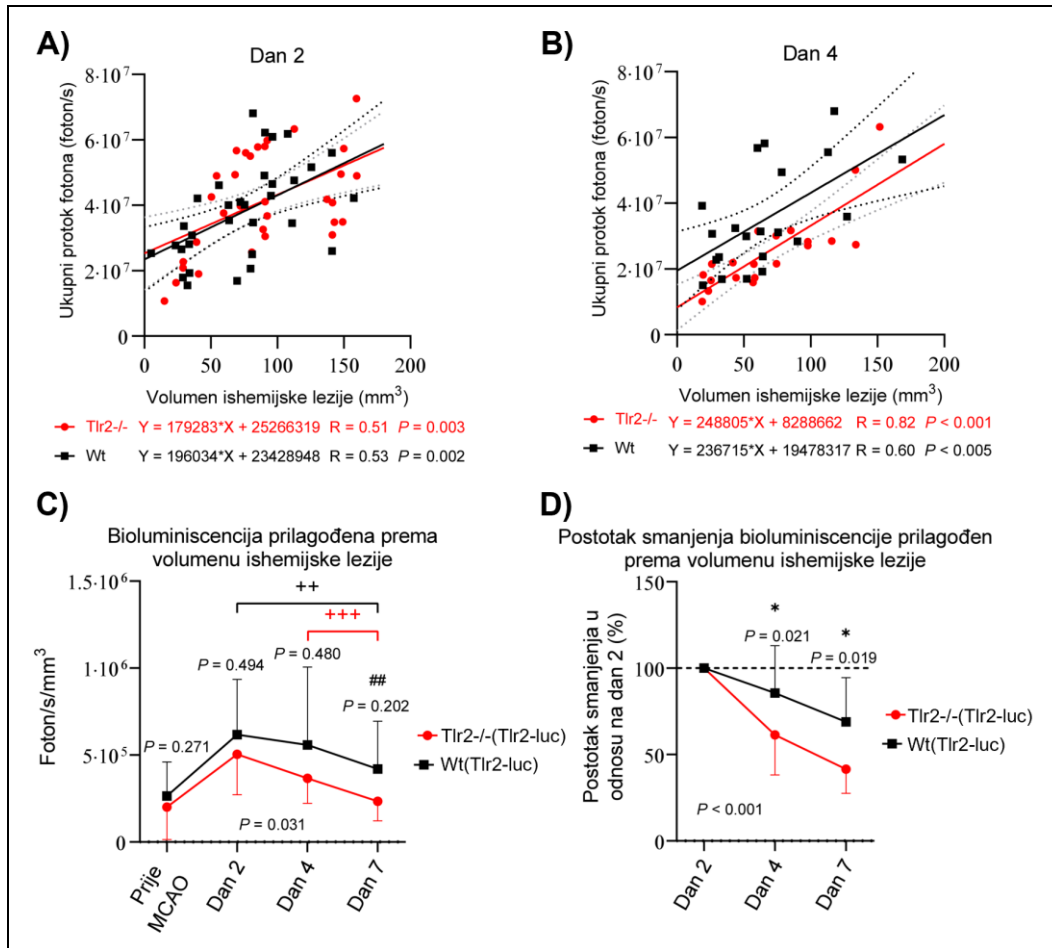
Uočena je pozitivna korelacija između volumena ishemijske lezije i bioluminiscencije 2 i 4 dana nakon moždanog udara. Porastom volumena ishemijske lezije se povećavala bioluminiscencija, tj. izražaj gena *Tlr2*. Korelacija je uočena kod oba soja, dakle nije ovisila o



prisutnosti proteinskog produkta TLR2. Dva dana nakon moždanog udara oba soja su imala umjerenu korelaciju između volumena ishemijske lezije i bioluminiscencije ( $R = 0.51$  za Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc),  $P = 0.003$ ;  $R = 0.53$  za Wt(Tlr2-luc),  $P = 0.002$ ) (**Slika 25A**). Četiri dana nakon moždanog udara miševi Wt(Tlr2-luc) su zadržali umjerenu korelaciju ( $R = 0.59$ ,  $P = 0.005$ ) dok je soj Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) pokazivao visoku korelaciju ( $R = 0.82$ ,  $P < 0.001$ ) između volumena ishemijske lezije i bioluminiscencije (**Slika 25B**). Sedam dana nakon tMCAO nije dobivena korelacija između volumena ishemijske lezije i bioluminiscencije ( $R = 0.25$  za Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc),  $P = 0.411$ ;  $R = 0.11$  za Wt(Tlr2-luc),  $P = 0.709$ ). Razlog za ovakav rezultat je činjenica da je na dan 7 bioluminiscencija bila usporediva s bazalnim vrijednostima, dok su miševi istovremeno imali izraženu leziju. Također, uspoređivani su nagibi pravaca linearne regresije, ali nisu uočene razlike između sojeva. Intenzitet upale posredovane genom *Tlr2* praćen bioluminiscencijom pokazao se kao dobar prediktor veličine ishemijske lezije u akutnoj fazi moždanog udara, neovisno o prisutnosti funkcionalnog receptora TLR2.

S obzirom na pokazanu korelaciju između volumena ishemijske lezije i bioluminiscencije, rezultati bioluminiscencije su prilagođeni prema volumenu ishemijske lezije izmjenom 2 dana nakon tMCAO (izraženom u mm<sup>3</sup>). Cilj je bio odrediti utjecaj prisutnosti receptora TLR2 na intenzitet upale po volumenu ishemijske lezije. Sveukupno, miševi Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) su imali manju bioluminiscenciju prilagođenu prema volumenu ishemijske lezije u odnosu na soj Wt(Tlr2-luc) ( $P = 0.031$ ). Nije dobivena značajna razlika između sojeva na pojedinim vremenskim točkama, međutim uočene su razlike u dinamici razmjera smanjenja bioluminiscencije prilagođene prema volumenu ishemijske lezije. Kod soja Wt(Tlr2-luc) značajni pad ( $P = 0.009$ ) je uočen tek između dana 2 ( $6.17 \times 10^5 \pm 3.18 \times 10^5$  foton/s/mm<sup>3</sup>) i 7 ( $4.19 \times 10^5 \pm 2.75 \times 10^5$  foton/s/mm<sup>3</sup>), dok je kod soja Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) do značajnog pada ( $P < 0.001$ ) došlo između dana 4 ( $3.66 \times 10^5 \pm 1.43 \times 10^5$  foton/s/mm<sup>3</sup>) i 7 ( $2.34 \times 10^5 \pm 1.12 \times 10^5$  foton/s/mm<sup>3</sup>) nakon tMCAO (**Slika 25C**). Kako bi se istaknule razlike u postotku smanjenja bioluminiscencije prilagođene prema volumenu ishemijske lezije, svi rezultati su normalizirani na vrijednosti dobivene 2 dana nakon tMCAO. Gledajući sveukupni efekt, miševi Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) su imali veće smanjenje bioluminiscencije prilagođene prema volumenu ishemijske lezije u odnosu na soj Wt(Tlr2-luc) ( $P < 0.001$ ). Značajne razlike su uočene u svim promatranim vremenskim točkama: 4 ( $61.33 \pm 23.16\%$  za Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc),  $85.61 \pm 27.33\%$  za Wt(Tlr2-luc);  $P = 0.021$ ) i 7 dana nakon moždanog udara ( $41.54 \pm 14.03\%$  za Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc),  $68.91 \pm 25.56\%$  za Wt(Tlr2-luc);  $P = 0.019$ ) (**Slika 25D**). Ovi rezultati pokazuju da je nedostatak

receptora TLR2 doveo do smanjene razine bioluminiscencije prilagođene prema volumenu ishemijske lezije u akutnoj fazi moždanog udara.



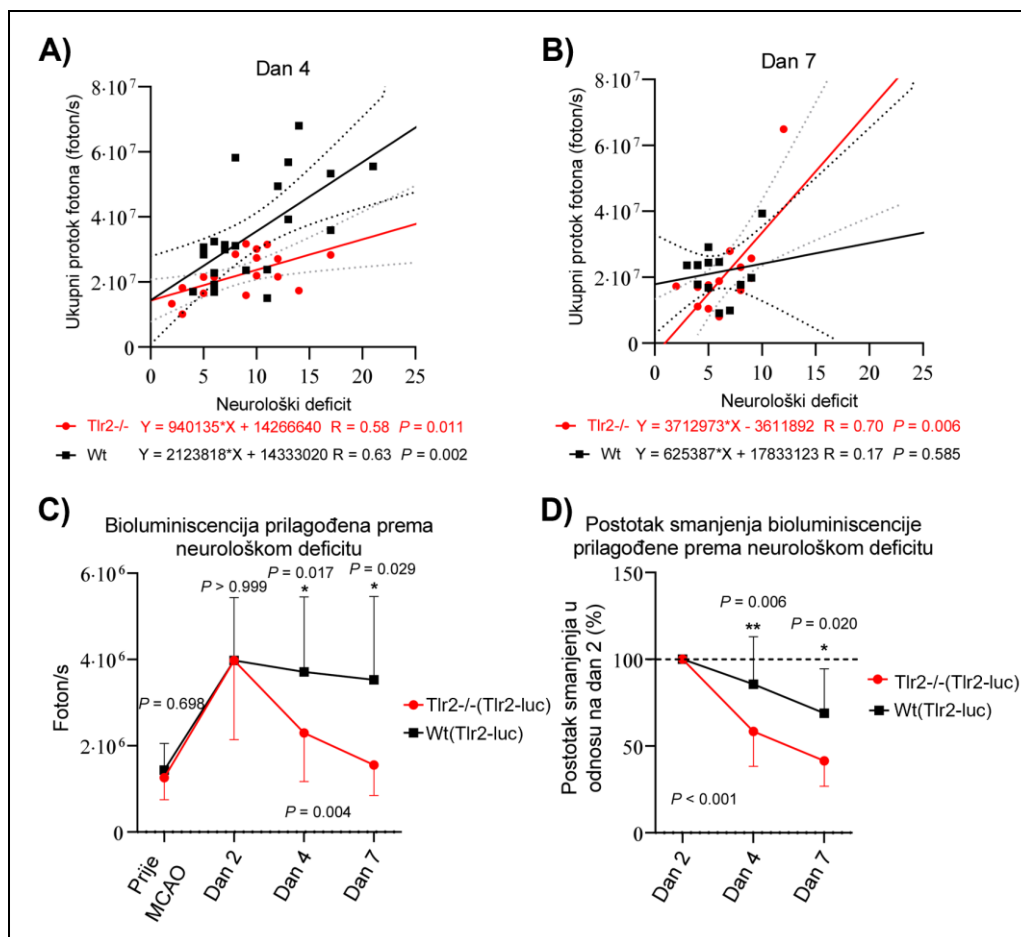
**Slika 25:** Poveznica između rezultata magnetske rezonancije i *in vivo* bioluminiscencije za miševе Wt(Tlr2-luc) i Tlr2-/(Tlr2-luc). Korelacija između volumena ishemijske lezije (u mm<sup>3</sup>) i bioluminiscentnog signala (foton/s) 2 (A) i 4 (B) dana nakon tMCAO kod miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2-/(Tlr2-luc). Za svaki soj je napisana jednađba pravca linearne regresije te je izračunat Pearsonov koeficijent korelacije i statistička značajnost korelacije. PUNE linije predstavljaju pravce linearne regresije, dok isprekidane linije pokazuju 95%-tne intervale pouzdanosti. C) Bioluminiscencija prilagođena prema volumenu lezije dobivenom 2 dana nakon tMCAO. Vidljivo je kako miševi s nedostatkom receptora TLR2 imaju značajno manju bioluminiscenciju prilagođenu prema volumenu lezije u odnosu na miševе Wt(Tlr2-luc). D) Postotak smanjenja bioluminiscencije prilagođene prema volumenu ishemijske lezije. # - značajno u odnosu na bazalne vrijednosti, \* - značajna razlika između sojeva, + - značajna razlika između vremenskih točaka; #/\*/+ - P < 0.050, ##/\*\*/++ - P < 0.010, ###/\*\*\*/+++ - P <

0.001, dobiveno dvosmjernim ANOVA testom za ponovljena mjerenja i *post-hoc* analizom prema Sidaku (\*) i prema Tukey-u (# i +).

Zatim, kako bi se upotpunili rezultati logističke regresije kojom je pokazana poveznica između bioluminiscencije i neurološkog oštećenja, napravljena je korelacija između neurološkog deficita i bioluminiscencije zasebno za miševe Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) u svim promatranim vremenskim točkama. Dobivena je pozitivna korelacija neurološkog deficita i bioluminiscencije, tj. povećanjem neurološkog deficita istovremeno se povećao izražaj gena *Tlr2*. Umjerena korelacija bioluminiscencije i neurološkog deficita uočena je 4 dana nakon tMCAO kod oba soja (Wt(Tlr2-luc):  $R = 0.58$ ,  $P = 0.011$ ; Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc):  $R = 0.63$ ,  $P = 0.020$ ) (**Slika 26A**). Dva dana nakon tMCAO miševi Wt(Tlr2-luc) ( $R = 0.38$ ,  $P = 0.032$ ) su imali slabu korelaciju između bioluminiscencije i neurološkog deficita, dok kod miševa Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) korelacija nije bila statistički značajna ( $R = 0.26$ ,  $P = 0.147$ ). Međutim, 7 dana nakon tMCAO miševi Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) ( $R = 0.70$ ,  $P = 0.006$ ) su imali visoki koeficijent korelacije između bioluminiscencije i neurološkog deficita dok kod miševa Wt(Tlr2-luc) ( $R = 0.17$ ,  $P = 0.585$ ) više nije bilo korelacije (**Slika 26B**). Bioluminiscencija se pokazala kao dobar prediktor neurološkog deficita neovisno o prisutnosti funkcionalnog receptora TLR2 isključivo 4 dana nakon tMCAO. U ostalim vremenskim točkama pouzdanost predikcije neurološkog oštećenja procjenom upale posredovane genom *Tlr2* uvelike je ovisila o prisutnosti samog receptora TLR2.

Sljedeći cilj bio je pokazati utjecaj receptora TLR2 na upalni odgovor prilagođen prema neurološkom oštećenju. U tu svrhu rezultati bioluminiscencije korigirani su na neurološki deficit izmjeren 2 dana nakon tMCAO. Slično prethodnim rezultatima, bioluminiscencija prilagođena prema neurološkom deficitu bila je najveća 2 dana nakon tMCAO (Wt(Tlr2-luc):  $3.98 \times 10^6 \pm 1.46 \times 10^6$  foton/s, Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc):  $3.98 \times 10^6 \pm 1.84 \times 10^6$  foton/s) kod oba soja te se postepeno smanjila do dana 7 (**Slika 26C**). Sveukupno gledajući, miševi bez funkcionalnog receptora TLR2 su imali manju ( $P = 0.004$ ) bioluminiscenciju prilagođenu prema neurološkom deficitu u odnosu na miševe Wt(Tlr2-luc), a razlike između sojeva bile su prisutne 4 (Wt(Tlr2-luc):  $3.37 \times 10^6 \pm 1.73 \times 10^6$  foton/s, Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc):  $2.30 \times 10^6 \pm 1.13 \times 10^6$  foton/s;  $P = 0.017$ ) i 7 (Wt(Tlr2-luc):  $3.53 \times 10^6 \pm 1.93 \times 10^6$  foton/s, Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc):  $1.55 \times 10^6 \pm 7.07 \times 10^5$  foton/s;  $P = 0.029$ ) dana nakon tMCAO (**Slika 26C**). Zatim su rezultati normalizirani na vrijednosti dobivene 2 dana nakon tMCAO kako bi se utvrdile razlike između sojeva u postotku smanjenja

bioluminiscencije prilagođene prema neurološkom deficitu. Miševi bez funkcionalnog receptora TLR2 imali su veći ( $P < 0.001$ ) postotak smanjenja bioluminiscencije prilagođene prema neurološkom deficitu u odnosu na životinje Wt(Tlr2-luc), a razlike su bile prisutne 4 (Wt(Tlr2-luc):  $85.61 \pm 27.33\%$ , Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc):  $58.41 \pm 20.16\%$ ;  $P = 0.006$ ) i 7 (Wt(Tlr2-luc):  $68.91 \pm 25.56\%$ , Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc):  $41.42 \pm 14.65\%$ ;  $P = 0.020$ ) dana nakon tMCAO (**Slika 26D**). Sveukupno gledajući, nedostatak receptora TLR2 doveo je do smanjene upale posredovane aktivacijom gena *Tlr2* prilagođene prema jačini neurološkog oštećenja te do njenog većeg postotka smanjenja. Miševi s onemogućenim receptorom TLR2 imali su manji upalni odgovor nakon tMCAO u odnosu na miševe Wt(Tlr2-luc) s istim neurološkim deficitom.



**Slika 26:** Poveznica između neurološkog oštećenja i rezultata *in vivo* bioluminiscencije za miševe Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc). Korelacije između neurološkog deficita i bioluminiscencije (ukupni protok fotona, foton/s) 4 (**A**) i 7 (**B**) dana nakon tMCAO kod miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc). Za svaku korelaciju napisana je jednačba pravca linearne regresije, Pearsonov koeficijent korelacije i statistička značajnost korelacije. Punom linijom

prikazani su pravci linearne regresije, a isprekidane krivulje pokazuju 95%-tne intervale pouzdanosti. **C)** Bioluminiscencija prilagođena prema jačini neurološkog oštećenja dobivena korekcijom rezultata bioluminiscencije na neurološki deficit izmjeren 2 dana nakon tMCAO. Vidljivo je kako miševi s nedostatkom receptora TLR2 imaju značajno manju bioluminiscenciju prilagođenu prema neurološkom deficitu u odnosu na miševe Wt(Tlr2-luc). **D)** Postotak smanjenja bioluminiscencije prilagođene prema neurološkom deficitu. \* - značajna razlika između sojeva; \* -  $P < 0.050$ , \*\* -  $P < 0.010$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ , dobiveno dvosmjernim ANOVA testom za ponovljena mjerenja s *post-hoc* korekcijom prema Sidaku.

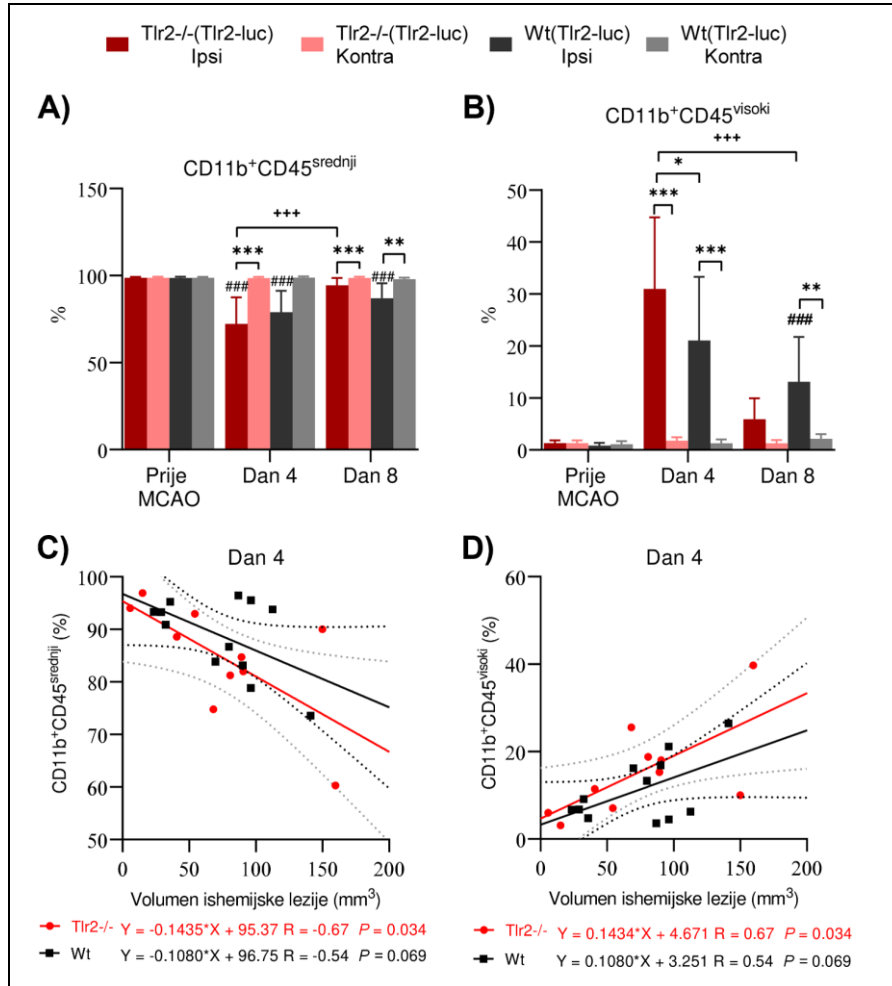
## 5.5. Nedostatak receptora TLR2 dovodi do promjena u aktivaciji imunskih stanica nakon ishemijske lezije mozga

### 5.5.1. Nedostatak receptora TLR2 pospješuje smanjenje udjela aktivirane mikroglije nakon moždanog udara

Aktivacija mikroglije nakon ishemijskog moždanog udara karakterizirana je promjenom morfologije stanice, promjenom u izražaju površinskih receptora i lučenjem citokina te ima važnu ulogu u pokretanju procesa upale središnjeg živčanog sustava (22). U ovom istraživanju aktivacija mikroglije u mozgu nakon moždanog udara praćena je metodom protočne citometrije. Jedna od karakteristika aktivirane mikroglije je povećan izražaj površinskog receptora CD45, stoga se taj biljeg primjenjuje se za razlikovanje aktivirane i mirujuće mikroglije metodom protočne citometrije. Mirujuća mikroglija definirana je kao populacija stanica koje imaju srednje jaki intenzitet fluorescentnog signala na protočnom citometru za biljeg CD45, dok aktivirana mikroglija ima visoki intenzitet signala za CD45. Uz CD45 na protočnoj citometriji koristi se još i CD11b, biljeg mijeloidne linije, za definiranje populacije stanica mikroglije (139). Stoga je mirujuća mikroglija u ovim pokusima bila definirana kao populacija stanica  $CD11b^+CD45^{\text{srednji}}$ , a aktivirana mikroglija je definirana kao  $CD11b^+CD45^{\text{visoki}}$ . Treba napomenuti da se u populaciji stanica aktivirane mikroglije nalaze i makrofagi koji imaju isti ekspresijski profil ( $CD11b^+CD45^{\text{visoki}}$ ) te se korištenjem antitijela CD11b i CD45 ne mogu razlikovati ove dvije vrste stanica (140, 141).

Najprije je analizirana mirujuća mikroglija ( $CD11b^+CD45^{\text{srednji}}$ ), a rezultati su prikazani kao udio mirujuće mikroglije u ukupnom broju stanica mikroglije. Prije izazivanja ishemijske lezije prevladavala je mirujuća mikroglija s udjelom većim od 98%, a nedostatak receptora TLR2 nije promijenio udio mirujuće mikroglije prije izazivanja ishemijske lezije ( $P > 0.999$ ). Četiri dana nakon tMCAO kod oba soja je došlo do smanjenja ( $P < 0.001$ ) udjela mirujuće mikroglije na ipsilateralnoj hemisferi ( $72.20 \pm 15.22\%$  za  $Tlr2^{-/-}(Tlr2\text{-luc})$ ,  $78.95 \pm 12.23\%$  za  $Wt(Tlr2\text{-luc})$ ) u odnosu na kontralateralnu ( $98.45 \pm 0.76\%$  za  $Tlr2^{-/-}(Tlr2\text{-luc})$ ,  $98.72 \pm 0.75\%$  za  $Wt(Tlr2\text{-luc})$ ), međutim nije bila prisutna razlika između sojeva ( $P = 0.373$ ) (**Slika 27A**). Do 8. dana udio mirujuće mikroglije na ipsilateralnoj hemisferi značajno se povećao u odnosu na dan 4 ( $P < 0.001$ ) kod miševa  $Tlr2^{-/-}(Tlr2\text{-luc})$  ( $94.37 \pm 4.17\%$ ), čime se vratio na bazalnu vrijednost ( $98.70 \pm 0.54\%$ ), dok je na kontralateralnoj hemisferi ( $98.62 \pm 0.65\%$ ) ostao nepromijenjen. Kod miševa  $Wt(Tlr2\text{-luc})$  8 dana nakon moždanog udara udio mirujuće mikroglije na ipsilateralnoj hemisferi ( $86.89 \pm 8.62\%$ ) ostao je značajno smanjen u odnosu na kontralateralnu

hemisferu ( $97.87 \pm 0.90\%$ ;  $P = 0.009$ ) te u odnosu na bazalnu vrijednost ( $98.55 \pm 0.76\%$ ;  $P < 0.001$ ) (Slika 27A).



**Slika 27:** Rezultati protočne citometrije za udio mirujuće (A) i aktivirane mikroglije i makrofaga (B). Analizirani su mišji mozgovi sojeva Wt(Tlr2-luc) i Tlr2-/(Tlr2-luc) izolirani prije operacije te 4 i 8 dana nakon tMCAO. Korelacije između volumena ishemijske lezije (izraženog u mm<sup>3</sup>) 4 dana nakon tMCAO i udjela aktivirane (C) i mirujuće mikroglije (D) u cjelokupnom mozgu miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2-/(Tlr2-luc). Za svaku korelaciju napisana je jednadžba pravca linearne regresije, Pearsonov koeficijent korelacije i statistička značajnost korelacije. Punim crtama označeni su pravci linearne regresije, dok isprekidane krivulje predstavljaju 95%-tne intervale pouzdanosti. # - značajno u odnosu na bazalne vrijednosti, \* - značajna razlika između sojeva ili hemisfera, + - značajna razlika između vremenskih točaka; #/\*/+ -  $P < 0.050$ , ##/\*\*/++ -  $P < 0.010$ , ###/\*\*\*/+++ -  $P < 0.001$ , dobiveno dvosmjernim ANOVA testom za neponovljena mjerenja uz *post-hoc* analizu prema Tukey-u.

Udio aktivirane mikroglije i makrofaga pokazao je recipročne rezultate. Bazalne vrijednosti su bile manje od 1.50% za oba soja te nije bilo razlike između sojeva ( $P > 0.999$ ). Međutim, 4 dana nakon izazivanja ishemijske lezije uočeno je značajno povećanje udjela aktivirane mikroglije i makrofaga na ipsilateralnoj hemisferi u odnosu na kontralateralnu kod miševa Wt(Tlr2-luc) ( $21.05 \pm 12.23\%$  i  $1.28 \pm 0.75\%$ ;  $P < 0.001$ ) i Tlr2-/(Tlr2-luc) ( $30.96 \pm 13.78\%$  i  $1.77 \pm 0.66\%$ ;  $P < 0.001$ ) (**Slika 27B**). Udjeli aktivirane mikroglije i makrofaga na kontralateralnoj hemisferi su i nakon moždanog udara bile usporedive s bazalnim vrijednostima kod oba soja ( $P > 0.999$ ). Ovakvi rezultati su ukazivali da se aktivacija mikroglije i infiltracija makrofaga u tkivo mozga odvija isključivo u hemisferi zahvaćenj ishemijskom ozljedom. Miševi s onemogućenim receptorom TLR2 imali su veći ( $P = 0.012$ ) udio aktivirane mikroglije na ipsilateralnoj hemisferi 4 dana nakon moždanog udara u odnosu na soj Wt(Tlr2-luc). Taj udio se kod miševa Tlr2-/(Tlr2-luc) značajno smanjio ( $P < 0.001$ ) do 8. dana ( $5.90 \pm 4.02\%$ ), kada je bio usporediv s bazalnom vrijednosti ( $1.30 \pm 0.54\%$ ;  $P = 0.550$ ) (**Slika 27B**). Kod soja Wt(Tlr2-luc) nije uočeno smanjenje udjela aktivirane mikroglije i makrofaga na ipsilateralnoj hemisferi 8 dana ( $13.11 \pm 8.624\%$ ) nakon moždanog udara u odnosu na 4. dan ( $P = 0.083$ ). Sukladno, kod miševa Wt(Tlr2-luc) udio aktivirane mikroglije i makrofaga na ipsilateralnoj hemisferi ostao je povećan u odnosu na vrijednosti kontralateralne hemisfere ( $2.13 \pm 0.90\%$ ;  $P = 0.002$ ) te u odnosu na bazalnu vrijednost ( $0.82 \pm 0.54\%$ ;  $P < 0.001$ ) (**Slika 27B**). Na dan 8 više nije bilo značajne razlike između sojeva ( $P = 0.124$ ) u udjelu aktivirane mikroglije i makrofaga.

Rezultati protočne citometrije pokazali su veću inicijalnu aktivaciju mikroglije nakon moždanog udara kod miševa s nedostatkom receptora TLR2, međutim ove vrijednosti su značajno smanjene do 8. dana. Kod miševa s funkcionalnim receptorom TLR2 nije došlo do ovako značajnog pada aktivacije mikroglije, što upućuje na potencijalnu ulogu TLR2 u regulaciji procesa aktivacije mikroglije nakon moždanog udara.

Kako bi se utvrdila povezanost aktivacije mikroglije i volumena ishemijske lezije, napravljena je linearne regresija te je izračunat Pearsonov koeficijent korelacije. Značajne korelacije dobivene su za udjele mikroglije 4 dana nakon tMCAO, dok rezultati izmjereni 8 dana nakon tMCAO nisu pokazali značajnu korelaciju s volumenom lezije. Nadalje, korelacija je bila prisutna samo za vrijednosti aktivirane mikroglije izračunate za cjelokupni mozak, dok udio aktivirane mikroglije i makrofaga isključivo na ipsilateralnoj hemisferi nije korelirao s volumenom ishemijske lezije. Ovakvi rezultati upućuju da je za optimalnu predikciju volumena



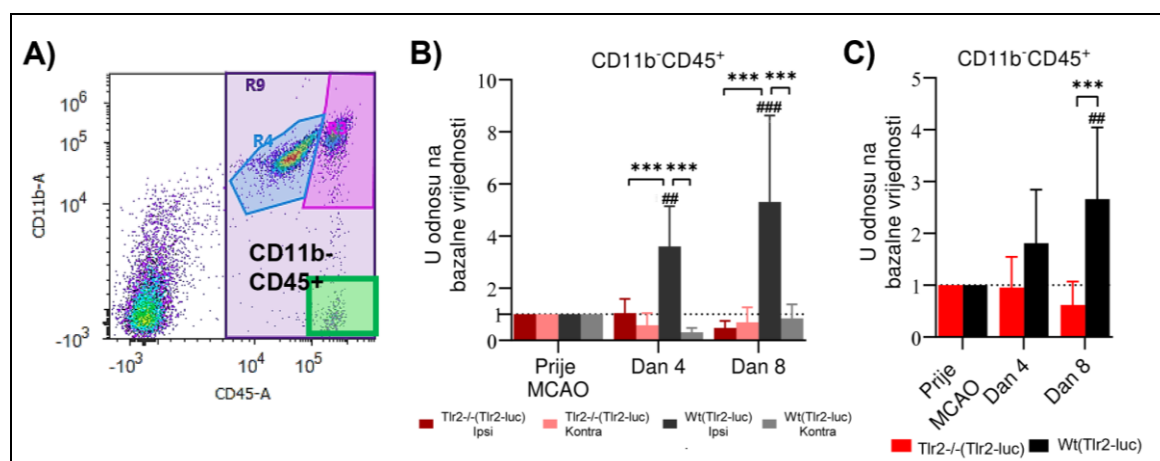
ishemijske lezije potrebno promatrati vrijednosti za cjelokupni mozak, bez obzira što nije uočeno značajno povećanje aktivirane mikroglije na kontralateralnoj hemisferi. Udio mirujuće mikroglije pokazao je negativnu korelaciju s volumenom lezije kod oba soja ukazujući da se porastom volumena lezije istovremeno smanjuje udio mirujuće mikroglije (Wt(Tlr2-luc):  $R = -0.54$ ,  $P = 0.069$ ; Tlr2-/(Tlr2-luc):  $R = -0.67$ ,  $P = 0.034$ ) (**Slika 27C**). Sukladno ovim opažanjima, udio aktivirane mikroglije pokazao je pozitivnu korelaciju s volumenom lezije kod oba soja, te su Pearsonovi koeficijenti korelacije imali recipročne vrijednosti u odnosu na rezultate za mirujuću mikrogliju (Wt(Tlr2-luc):  $R = 0.54$ ,  $P = 0.069$ ; Tlr2-/(Tlr2-luc):  $R = 0.67$ ,  $P = 0.034$ ) (**Slika 27D**). Povećanjem volumena ishemijske lezije istovremeno se povećao udio aktivirane mikroglije u mozgu. Sveukupno gledajući, ovakvi rezultati pokazuju da je količina mirujuće i aktivirane mikroglije 4 dana nakon moždanog udara bila dobar prediktor volumena ishemijske lezije, neovisno o prisutnosti funkcionalnog receptora TLR2.

### **5.5.2. Smanjeno nakupljanje limfocita nakon moždanog udara kod miševa Tlr2-/(Tlr2-luc)**

Osim imunoloških stanica središnjeg živčanog sustava, metodom protočne citometrije praćena je infiltracija limfocita u tkivo mozga nakon ishemijskog moždanog udara. Limfociti izražavaju biljeg pan-leukocita CD45, ali ne izražavaju biljeg mijeloidne linije CD11b. Stoga je populacija limfocita na protočnoj citometriji bila definirana kao CD11b<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> (**Slika 28A**). Udio limfocita u ukupnom broju stanica bio je normaliziran na vrijednosti prije intervencije pa su konačni rezultati prikazani kao stopa povećanja udjela limfocita u mozgu nakon moždanog udara.

Najprije su analizirani rezultati udjela limfocita za svaku hemisferu zasebno. Nakupljanje limfocita nakon moždanog udara bilo je prisutno isključivo u ipsilateralnoj hemisferi soja Wt(Tlr2-luc). Sve vrijednosti stope povećanja limfocita za soj Tlr2-/(Tlr2-luc) i za kontralateralnu hemisferu soja Wt(Tlr2-luc) bile su usporedive s bazalnim rezultatima (**Slika 28B**). Četiri dana nakon moždanog udara udio limfocita u ipsilateralnoj hemisferi soja Wt(Tlr2-luc) povećao se  $3.60 \pm 1.55$  puta ( $P = 0.002$ ), dok je do 8. dana udio limfocita bio  $5.31 \pm 3.32$  puta veći u odnosu na vrijednosti prije moždanog udara ( $P < 0.001$ ) (**Slika 28B**). U obje vremenske točke povećanje limfocita u ipsilateralnoj hemisferi soja Wt(Tlr2-luc) bilo je značajno veće u odnosu na vrijednosti kontralateralne hemisfere ( $P < 0.001$ ) te u odnosu na miševe Tlr2-/(Tlr2-luc) ( $P < 0.001$ ).

Iz podataka za hemisfere izračunato je povećanje limfocita u cijelom mozgu. Rezultati su ponovno pokazali izraženo nakupljanje limfocita nakon moždanog udara isključivo kod soja Wt(Tlr2-luc). Na dan 4 miševi Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) su imali udio limfocita usporediv s bazalnom vrijednosti ( $0.95 \pm 0.59$  puta veći,  $P > 0.999$ ). Soj Wt(Tlr2-luc) imao je nešto veći udio limfocita ( $1.80 \pm 1.03$  puta veći) 4 dana nakon moždanog udara, međutim ova vrijednost nije bila značajno veća ( $P = 0.254$ ) u odnosu na soj Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) (Slika 28C). Osam dana nakon moždanog udara udio limfocita je ostao na razini bazalne vrijednosti kod miševa Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) ( $0.62 \pm 0.45$  puta veći,  $P = 0.889$ ). Kod soja Wt(Tlr2-luc) došlo je do povećanja udjela limfocita ( $2.66 \pm 1.38$  puta veći) koji je sada bio statistički značajno veći u odnosu na soj Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) ( $P < 0.001$ ) i na bazalne vrijednosti ( $P = 0.01$ ) (Slika 28C). Sveukupno gledajući, nedostatak receptora TLR2 doveo je do smanjene infiltracije limfocita u tkivo mozga nakon ishemijske ozljede, ukazujući na njegovu važnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora posredovanog infiltrirajućim limfocitima iz periferne krvi.



**Slika 28:** Rezultati analize udjela limfocita metodom protočne citometrije u mozgovima miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc). **A)** Prikaz strategije razvrstavanja imunskih stanica na protočnoj citometriji. Limfociti su bili definirani kao populacija stanica pozitivnih za izražaj receptora CD45, ali negativnih za CD11b (CD11b<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>). Rezultati kvantifikacije limfocita prikazani kao stopa povećanja u odnosu na bazalne vrijednosti po hemisferama (**B**) te u cijelom mozgu (**C**). Vidljivo je povećanje udjela limfocita 8 dana nakon tMCAO isključivo kod miševa Wt(Tlr2-luc). # - značajno u odnosu na bazalne vrijednosti, \* - značajna razlika između sojeva ili hemisfera; #/\* -  $P < 0.050$ , ##/\*\* -  $P < 0.010$ , ###/\*\*\* -  $P < 0.001$ , dobiveno dvosmjernim ANOVA testom za neponovljena mjerenja te *post-hoc* analizom prema Tukey-u.

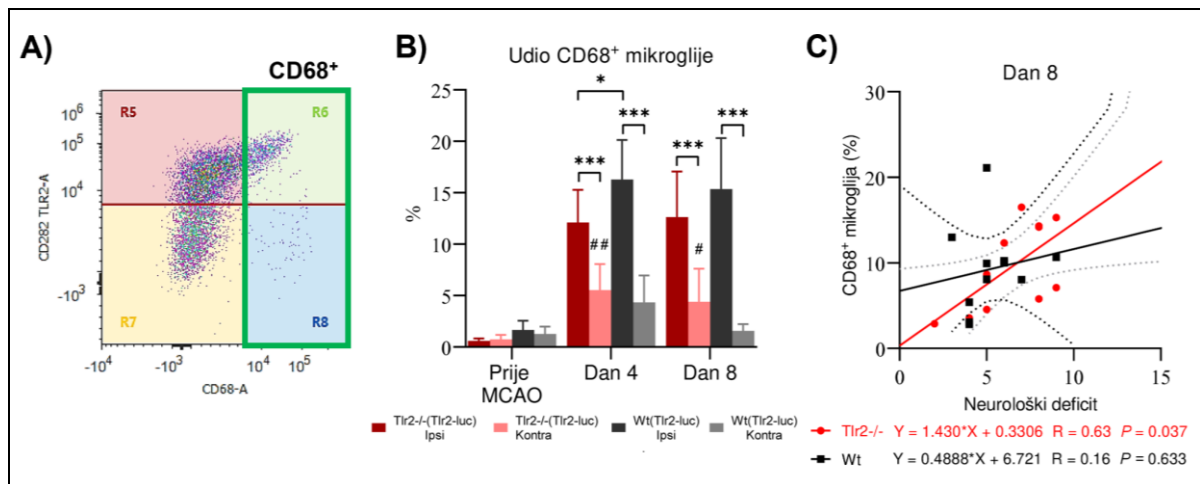
## 5.6. Nedostatak receptora TLR2 smanjuje izražaj biljega upale posredovane mikroglijom nakon ishemijskog moždanog udara

### 5.6.1. Nedostatak receptora TLR2 dovodi do smanjenog izražaja CD68 nakon ishemije

Osim povećanja izražaja CD45, aktivirana mikroglija ima povećani izražaj mnogih drugih biljega upale, uključujući i CD68. Udio mikroglije koja izražava receptor CD68 nakon moždanog udara praćen je metodom protočne citometrije. Podaci su prikazani kao udio ukupnih stanica mikroglije koje izražavaju receptor CD68, a njegov izražaj je uočen na populaciji mirujuće mikroglije kao i na populaciji aktivirane mikroglije i makrofaga. Prije izazivanja ishemijske lezije mozga izražaj CD68 bio je minimalan, manje od 2% stanica mikroglije je izražavalo ovaj receptor ukazujući na odsustvo procesa upale. Nije uočena razlika između sojeva u izražaju CD68 prije izazivanja ishemijske lezije. Četiri dana nakon ishemijske lezije značajno se povećao udio mikroglije koji izražava CD68 kod oba soja, upućujući na diferencijaciju mikroglije iz mirujućeg u pro-upalni M1 fenotip. Aktivacija CD68 bila je više izražena na ipsilateralnoj hemisferi, međutim došlo je i do povećanja udjela CD68<sup>+</sup> mikroglije na kontralateralnoj hemisferi. Soj Wt(Tlr2-luc) je 4 dana nakon tMCAO imao značajno veći udio CD68<sup>+</sup> mikroglije na ipsilateralnoj hemisferi u odnosu na soj Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) ( $16.28 \pm 3.85\%$  za Wt(Tlr2-luc),  $12.11 \pm 3.17\%$  za Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc);  $P = 0.044$ ) (**Slika 29B**). Udio CD68<sup>+</sup> mikroglije na kontralateralnoj hemisferi iznosio je  $5.52 \pm 2.54\%$  kod soja Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc), što je značajno veće u odnosu na bazalnu vrijednost ( $0.77 \pm 0.42\%$ ;  $P = 0.003$ ). Povećanje udjela CD68 na kontralateralnoj hemisferi 4 dana nakon moždanog udara bilo je prisutno i kod soja Wt(Tlr2-luc) ( $4.33 \pm 2.62\%$ ), međutim ova razlika nije bila statistički značajna u odnosu na bazalnu vrijednost ( $1.26 \pm 0.72\%$ ;  $P = 0.138$ ) (**Slika 29B**). Osam dana nakon moždanog udara vrijednosti udjela CD68<sup>+</sup> mikroglije na ipsilateralnoj hemisferi bile su usporedive s vrijednostima 4. dana ( $15.36 \pm 4.95\%$  za Wt(Tlr2-luc),  $12.63 \pm 4.43\%$  za Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc)), ali se izgubila statistički značajna razlika između sojeva ( $P = 0.498$ ) (**Slika 29B**). Nadalje, uočeno je smanjenje udjela CD68 na kontralateralnoj hemisferi 8 dana nakon moždanog udara kod oba soja ( $1.56 \pm 0.65\%$  za Wt(Tlr2-luc),  $4.40 \pm 3.22\%$  za Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc)) s time da je udio CD68<sup>+</sup> mikroglije kod Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) miševa ostao značajno povećan u odnosu na bazalnu vrijednost ( $P = 0.025$ ) dok je kod soja Wt(Tlr2-luc) bio usporediv s bazalnom vrijednosti ( $P > 0.999$ ) (**Slika 29B**).

S obzirom da je CD68 biljeg pro-upalnog M1 fenotipa mikroglije i procesa fagocitoze posredovane mikroglijom i makrofagima, ovi rezultati su potvrdili prisutnost upale u središnjem živčanom sustavu nakon moždanog udara. Upalni procesi bili su izraženiji na ipsilateralnoj hemisferi, ali došlo je do značajne aktivacije pro-upalnog M1 fenotipa mikroglije i na kontralateralnoj hemisferi. Također, upala posredovana CD68<sup>+</sup> mikroglijom bila je prisutna na ipsilateralnoj hemisferi tijekom svih 8 dana nakon moždanog udara, neovisno o prisutnosti receptora TLR2. Ipak, nedostatak receptora TLR2 je uzrokovao smanjenju aktivaciju M1 fenotipa mikroglije u akutnoj fazi moždanog udara upućujući na njegovu ulogu u regulaciji M1/M2 polarizacije mikroglije.

Kako bi se objasnio utjecaj povećanja izražaja CD68 nakon moždanog udara, napravljena je korelacija rezultata protočne citometrije i neurološkog deficita. Korelacija je bila značajna jedino za rezultate izmjerene 8 dana nakon tMCAO te isključivo za udio CD68<sup>+</sup> mikroglije u cijelom mozgu. Dobivena je pozitivna korelacija udjela CD68<sup>+</sup> mikroglije i neurološkog deficita za miševе Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) uz umjereni Pearsonov koeficijent korelacije ( $R = 0.63$ ,  $P = 0.037$ ) (Slika 29C). Miševi s većim deficitom imali su veći udio CD68<sup>+</sup> mikroglije u mozgu. Međutim, miševi s funkcionalnim receptorom TLR2 nisu imali značajnu korelaciju neurološkog deficita i udjela CD68<sup>+</sup> mikroglije ( $R = 0.16$ ,  $P = 0.633$ ) (Slika 29C).



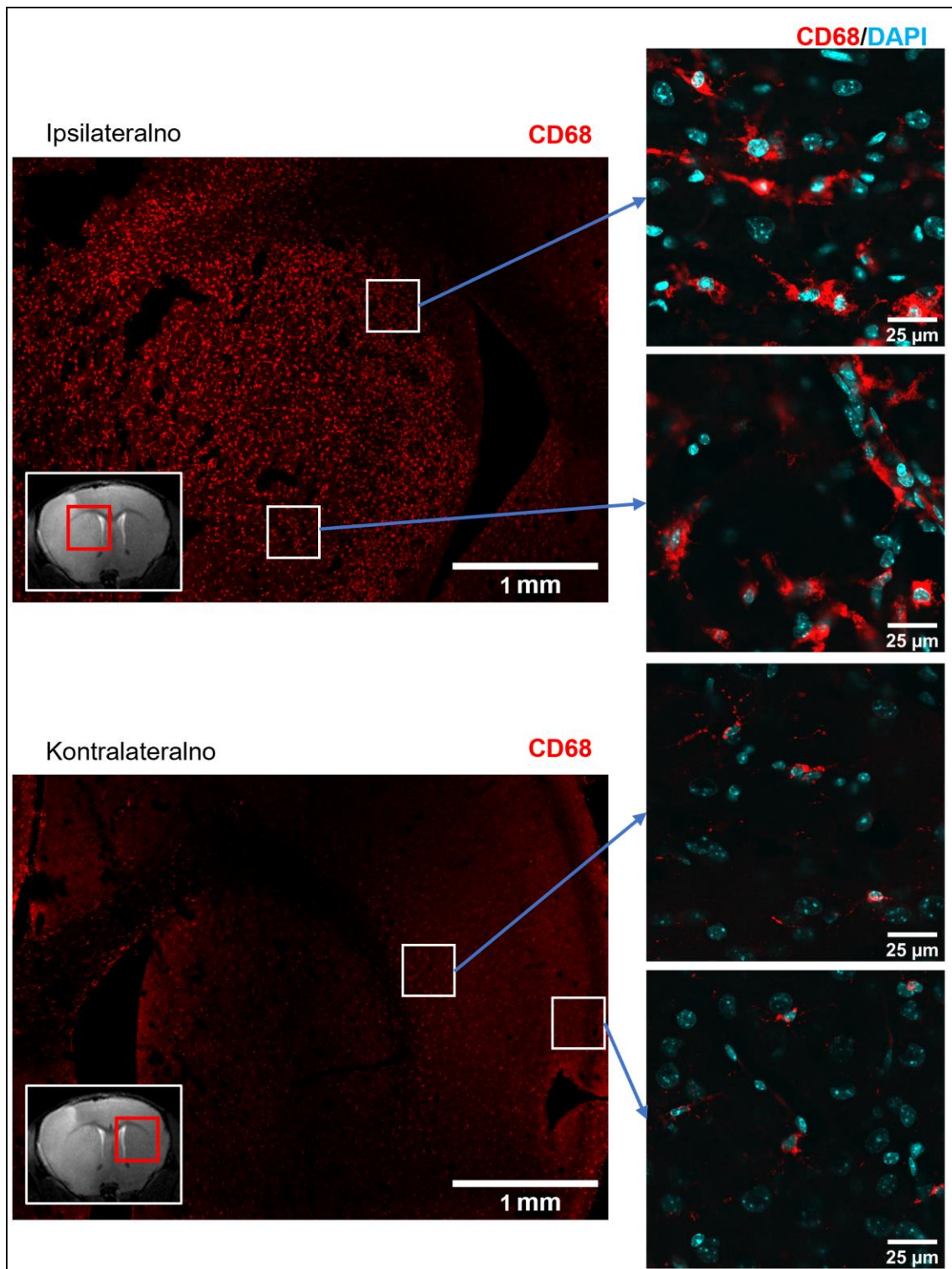
**Slika 29:** Izražaj CD68 u stanicama mikroglije kod sojeva Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) praćen metodom protočne citometrije. **A)** Reprezentativni prikaz strategije razdvajanja CD68<sup>+</sup> mikroglije protočnom citometrijom. **B)** Rezultati kvantifikacije udjela CD68<sup>+</sup> mikroglije nakon moždanog udara kod miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc). # - značajno u odnosu na bazalne vrijednosti, \* - značajna razlika između sojeva ili hemisfera; ##/\* -  $P < 0.050$ , ###/\*\* -  $P < 0.010$ ,

###/\*\*\* -  $P < 0.001$ , dobiveno dvosmjernim ANOVA testom za neponovljena mjerenja te *post-hoc* analizom prema Tukey-u. C) Korelacije između neurološkog deficita i udjela CD68<sup>+</sup> mikroglije u cjelokupnim mozgovima miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) izoliranim 8 dana nakon tMCAO. Za svaku korelaciju napisana je jednažba pravca linearne regresije, Pearsonov koeficijent korelacije i statistička značajnost korelacije. Punim crtama su označeni pravci linearne regresije, dok isprekidane krivulje predstavljaju 95%-tne intervale pouzdanosti.

### 5.6.2. Aktivacija CD68 nakon moždanog udara prisutna je u cijelom mozgu

S obzirom da je metodom protočne citometrije uočena značajna aktivacija CD68 na ipsilateralnoj i kontralateralnoj hemisferi, sljedeći cilj bio je odrediti koje regije mozga izražavaju CD68, tj. u kojim regijama mozga dolazi do aktivacije upalnih procesa posredovanih mikroglijom i makrofagima nakon moždanog udara. U tu svrhu napravljeno je imunohistokemijsko bojenje mišjih mozgova izoliranih 4 i 8 dana nakon tMCAO antitijelom za receptor CD68.

Na slikama dobivenim povećanjem 4× fluorescentni signal proteina CD68 bio je prisutan na sva tri promatrana presjeka mozga, a isti rezultati su dobiveni za oba soja i za obje vremenske točke nakon tMCAO. Uspoređivanjem snimki magnetne rezonancije i rezultata imunohistokemije bio je vidljiv najveći izražaj receptora CD68 na ipsilateralnoj hemisferi u području ishemijske lezije. Međutim, manji dio signala na ipsilateralnoj hemisferi nalazio se u okolnom tkivu, koje prema snimkama magnetske rezonancije nije zahvaćeno ishemijom. CD68 je izvan područja ishemijske lezije bio izražen po cijeloj ipsilateralnoj hemisferi, a nalazio se u moždanoj kori, strijatumu i hipokampusu (**Slika 30**). Isti rezultati su dobiveni za obje mišje linije čime se može zaključiti da nedostatak receptora TLR2 nije imao utjecaj na prostorni izražaj receptora, tj. na prostornu aktivaciju upalnih procesa posredovanih mikroglijom.



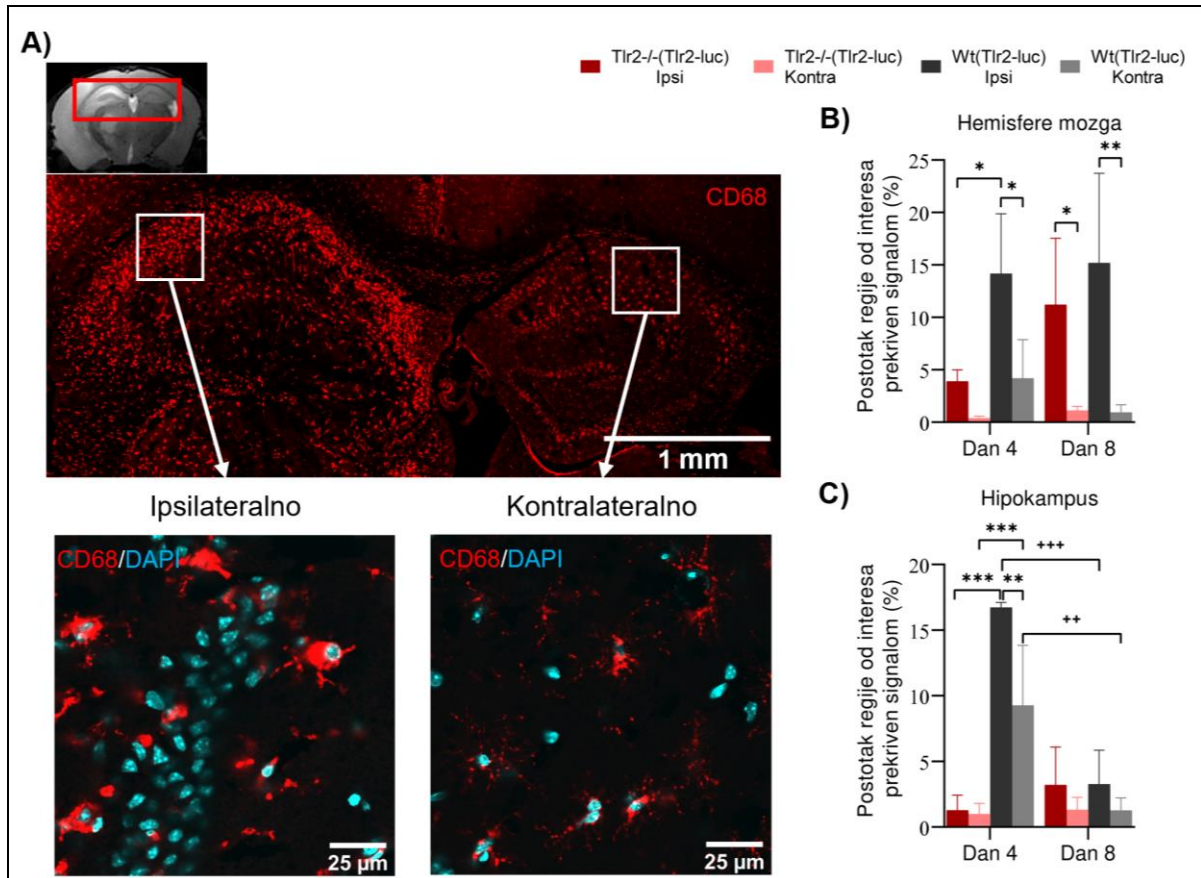
**Slika 30:** Reprezentativni rezultati imunohistokemijskog bojenja mišjih mozgova antitijelom za protein CD68 (crveno). Mišji mozgovi prikazani na slici su izolirani 4 dana nakon tMCAO. Na snimkama magnetske rezonancije crvenim kvadratom je označeno područje mozga u kojem je posnimljen fluorescentni signal proteina CD68. Izražaj receptora CD68 uočen je na obje hemisfere, a signal je bio vidljiv objektivom 40× (desno), kao i objektivom 4× (lijevo).

Na kontralateralnoj hemisferi bilo je manje fluorescentnog signala proteina CD68 u odnosu na ipsilateralnu hemisferu. Međutim, signal na kontralateralnoj hemisferi svejedno je bio prisutan na sva 3 promatrana presjeka mozga, kod oba soja i u obje vremenske točke nakon tMCAO. Inicijalna pretpostavka bila je da je izražaj receptora CD68 na kontralateralnoj hemisferi lokaliziran oko struktura koje povezuju hemisfere mozga: *corpus callosum* i *comisura anterior*. Međutim, rezultati su pokazali podjednako raspoređen fluorescentni signal receptora CD68 po cijeloj kontralateralnoj hemisferi, a povećan izražaj CD68 nije nađen samo oko struktura *corpus callosum* i *comisura anterior* (**Slika 30**). Suprotno očekivanjima, najveća aktivacija CD68 na kontralateralnoj hemisferi uočena je u hipokampusu, a ovakvi rezultati su dobiveni za oba soja i u obje vremenske točke nakon tMCAO. Ishemijska lezija nije uvijek zahvatila područje hipokampusa, međutim signal receptora CD68 je svejedno bio prisutan (**Slika 31A**).

Navedeni rezultati imunohistokemije kvantificirani su mjerenjem površine fluorescentnog signala receptora CD68, a prikazani su kao udio površine regije od interesa (cijele hemisfere ili hipokampusa) koji je prekriven fluorescentnim signalom. Izmjerena je površina fluorescentnog signala za cijelu hemisferu kako bi se validirali rezultati protočne citometrije, a zasebno je kvantificiran fluorescentni signal u hipokampusu s obzirom da je uočeno povećanje signala receptora CD68 na kontralateralnoj hemisferi.

Rezultati mjerenja površine signala proteina CD68 za cijele hemisfere potvrdili su veći izražaj CD68 na ipsilateralnoj hemisferi u odnosu na kontralateralnu. Četiri dana nakon moždanog udara soj Wt(Tlr2-luc) je imao značajno veći postotak površine ipsilateralne hemisfere prekriven sa signalom CD68 u odnosu na miševu Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) ( $14.17 \pm 5.71\%$  za Wt(Tlr2-luc),  $3.90 \pm 1.09\%$  za Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc);  $P = 0.034$ ). Udio površine signala proteina CD68 na kontralateralnoj hemisferi bio je nešto veći kod miševa Wt(Tlr2-luc) ( $4.18 \pm 3.68\%$ ) u odnosu na Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) ( $0.38 \pm 0.19\%$ ), ali ova razlika nije bila statistički značajna ( $P = 0.907$ ) (**Slika 31B**). Osam dana nakon tMCAO udio površine signala CD68 na ipsilateralnoj hemisferi kod miševa Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) ( $11.21 \pm 6.34\%$ ) se povećao u odnosu na 4. dan, ali razlika nije bila značajna ( $P = 0.250$ ). Fluorescentni signal na ipsilateralnoj hemisferi kod miševa Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) bio je značajno veći u odnosu na kontralateralnu hemisferu ( $1.11 \pm 0.39\%$ ,  $P = 0.036$ ) 8 dana nakon tMCAO. Isti trend većeg fluorescentnog signala na ipsilateralnoj ( $15.19 \pm 8.55\%$ ) u odnosu na kontralateralnu hemisferu ( $0.94 \pm 0.72\%$ ) uočen je i kod soja Wt(Tlr2-luc) ( $P = 0.003$ ) 8 dana nakon tMCAO (**Slika 31B**). Također, na dan 8 nije bilo razlike u udjelu površine fluorescentnog signala CD68 na ipsilateralnoj hemisferi između sojeva ( $P = 0.898$ ). Navedene

razlike između eksperimentalnih skupina na imunohistokemiji skoro savršeno odgovaraju rezultatima dobivenim protočnom citometrijom, čime su dodatno validirani navedeni rezultati.



**Slika 31:** Rezultati kvantifikacije imunohistokemijskog bojenja za protein CD68. **A)** Reprezentativne slike izražaja proteina CD68 (crveno) u ipsilateralnom i kontralateralnom hipokampusu 4 dana nakon tMCAO snimljene korištenjem objektiva s povećanjem 4× (velika slika) i 40× (manje slike). **B)** Kvantifikacija površine fluorescentnog signala receptora CD68 u cijelim hemisferama mozga miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2-/(Tlr2-luc). **C)** Udio površine hipokampusa prekrivene fluorescentnim signalom receptora CD68 kod miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2-/(Tlr2-luc). Rezultati kvantifikacije imunofluorescentnog signala prikazani su kao udio površine hemisfere prekrivene fluorescentnim signalom proteina CD68. \* - značajna razlika između sojeva ili hemisfera, + - značajna razlika između vremenskih točaka; \*/+ -  $P < 0.050$ , \*\*/++ -  $P < 0.010$ , \*\*\*/+++ -  $P < 0.001$ , dobiveno dvosmjernim ANOVA testom za neponovljena mjerenja uz *post-hoc* analizu prema Tukey-u.

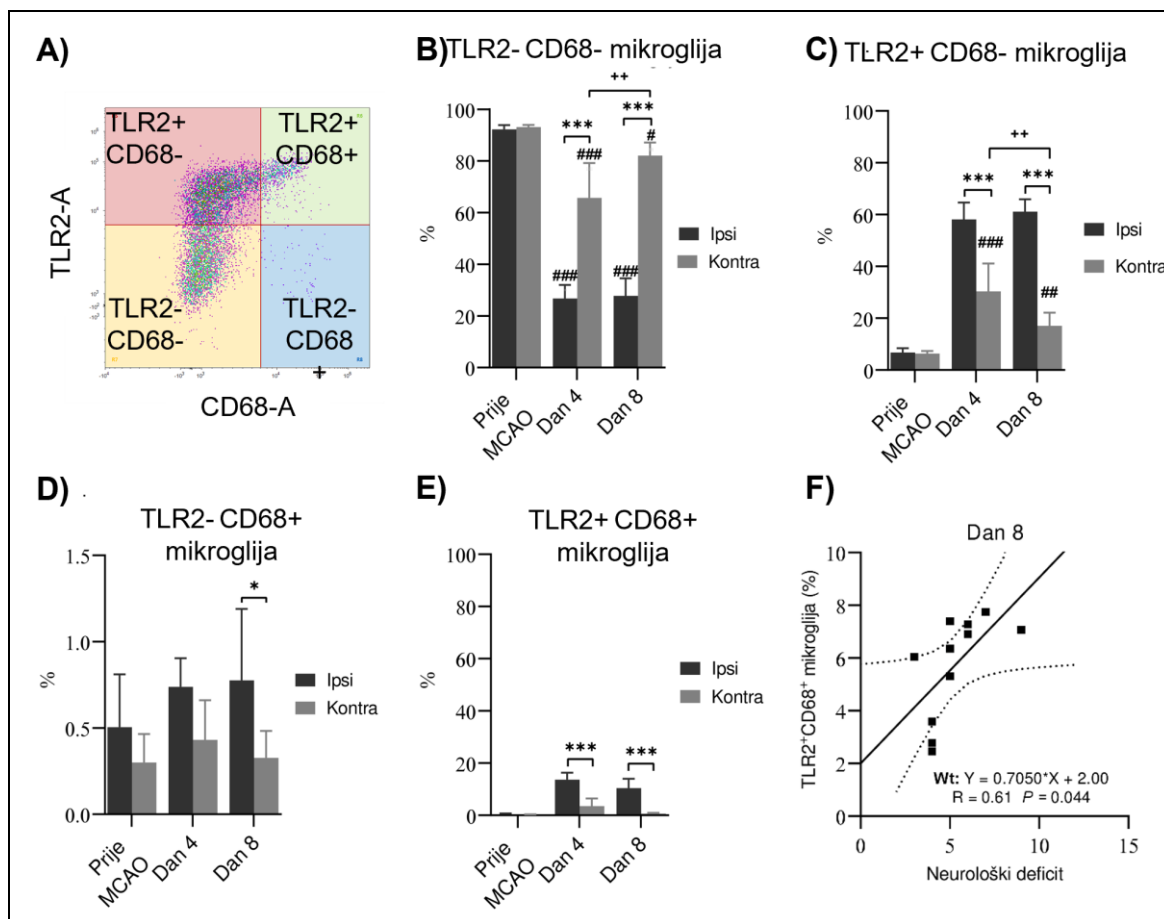


Kvantifikacija površine fluorescentnog signala CD68 u hipokampusu pokazala je značajno povećan signal na ipsilateralnoj i kontralateralnoj hemisferi soja Wt(Tlr2-luc) ( $16.73 \pm 0.38\%$  za ipsilateralnu,  $9.26 \pm 4.59\%$  za kontralateralnu hemisferu) u odnosu na Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) ( $1.28 \pm 1.15\%$  za ipsilateralnu,  $0.98 \pm 0.82\%$  za kontralateralnu hemisferu;  $P < 0.001$ ) 4 dana nakon moždanog udara (**Slika 31C**). Kod soja Wt(Tlr2-luc) površina signala CD68 bila je značajno veća na ipsilateralnoj hemisferi u odnosu na kontralateralnu ( $P = 0.006$ ), dok je kod miševa Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) površina signala bila podjednaka za obje hemisfere ( $P > 0.999$ ). Do 8. dana nakon tMCAO površina fluorescentnog signala CD68 kod soja Wt(Tlr2-luc) značajno se smanjila na obje hemisfere ( $3.27 \pm 2.58\%$  za ipsilateralnu,  $P < 0.001$ ;  $1.26 \pm 0.96\%$  za kontralateralnu hemisferu,  $P = 0.002$ ) (**Slika 31C**). Kod miševa Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) 8. dan je zadržana ista površina signala kao i na dan 4 ( $3.21 \pm 2.89\%$  za ipsilateralnu,  $1.31 \pm 0.95\%$  za kontralateralnu hemisferu). Osam dana nakon tMCAO više nije bilo razlike u udjelu površine signala CD68 između sojeva ( $P > 0.999$ ) (**Slika 31C**). Ovi rezultati su pokazali manju aktivaciju biljega upale nakon moždanog udara kod miševa s nefunkcionalnim receptorom TLR2, stoga su bili u skladu s prethodno opisanim rezultatima protočne citometrije.

### 5.6.3. Ko-ekspresija receptora CD68 i TLR2 na stanicama mikroglije nakon moždanog udara

S obzirom da su miševi Wt(Tlr2-luc) izražavali receptore TLR2 i CD68 na površini stanica mikroglije, sljedeći cilj bio je odrediti dinamiku promjene različitih fenotipova mikroglije nakon moždanog udara kod životinja Wt(Tlr2-luc). Korištenjem antitijela TLR2 i CD68 na protočnoj citometriji su dobivene četiri populacije stanice, tj. četiri fenotipa mikroglije: TLR2<sup>-</sup>CD68<sup>-</sup>, TLR2<sup>-</sup>CD68<sup>+</sup>, TLR2<sup>+</sup>CD68<sup>-</sup> i TLR2<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> (**Slika 32A**). Populacija TLR2<sup>-</sup>CD68<sup>-</sup> predstavljala je mirujuće stanice mikroglije, koje nisu izražavale niti jedan od promatranih upalnih biljega. Populacije stanica TLR2<sup>-</sup>CD68<sup>+</sup> i TLR2<sup>+</sup>CD68<sup>-</sup> izražavale su samo jedan od promatranih biljega upale (CD68 ili TLR2), a populacija stanica TLR2<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> je omogućila kvantificiranje ko-lokalizacije CD68 i TLR2 na stanicama mikroglije, tj. kvantifikaciju udjela receptora TLR2 povezanog s pro-upalnim M1 fenotipom mikroglije nakon moždanog udara. Rezultati su bili prikazani kao udio stanica mikroglije koje izražavaju pojedini fenotip. Ovi rezultati nisu se mogli kvantificirati i uspoređivati kod soja Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) s obzirom na nedostatak izražaja receptora TLR2.

Prije izazivanja moždanog udara dominirao je TLR2<sup>-</sup>CD68<sup>-</sup> fenotip mikroglije (>92%) koji ukazuje na nepostojanje upalnih procesa prije intervencije. Od ostalih fenotipova značajni udio imao je TLR2<sup>+</sup>CD68<sup>-</sup> (6.72 ± 1.69%), a fenotipovi TLR2<sup>-</sup>CD68<sup>+</sup> i TLR2<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> bili su zastupljeni u manje od 1% stanica mikroglije (**Slika 32**). Nakon izazivanja ishemijske lezije došlo je do smanjenja udjela anti-upalnog fenotipa TLR2<sup>-</sup>CD68<sup>-</sup> 4 i 8 dana nakon tMCAO. Najveće smanjenje uočeno je na ipsilateralnoj hemisferi (26.74 ± 5.27% za dan 4, 27.74 ± 6.80% za dan 8;  $P < 0.001$ , značajno u odnosu na bazalne vrijednosti), međutim udio se značajno smanjio i na kontralateralnoj hemisferi (65.71 ± 13.47% za dan 4,  $P < 0.001$ ; 82.08 ± 5.10% za dan 8,  $P = 0.027$ , značajno u odnosu na bazalne vrijednosti) (**Slika 32B**). Istovremeno se povećao udio fenotipova TLR2<sup>+</sup>CD68<sup>-</sup> i TLR2<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> na ipsilateralnoj i kontralateralnoj hemisferi 4 i 8 dana nakon moždanog udara. Najveći udio stanica mikroglije nakon tMCAO je izražavao fenotip TLR2<sup>+</sup>CD68<sup>-</sup>. Udio ovih stanica na ipsilateralnoj hemisferi bio je podjednak 4 (58.14 ± 6.47%) i 8 (61.10 ± 4.82%) dana nakon moždanog udara, ali na kontralateralnoj hemisferi je došlo do značajnog pada udjela TLR2<sup>+</sup>CD68<sup>-</sup> fenotipa između 4. i 8. dana nakon tMCAO (30.35 ± 10.76% za dan 4, 17.02 ± 5.09% za dan 8;  $P < 0.002$ ) (**Slika 32C**). Udio fenotipa TLR2<sup>-</sup>CD68<sup>+</sup> nije se značajno promijenio nakon moždanog udara te je u sve 3 promatrane vremenske točke iznosio manje od 1% (**Slika 32D**). Ko-lokalizacija receptora CD68 i TLR2 (TLR2<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> populacija mikroglije) nakon moždanog udara značajno više ( $P < 0.001$ ) je bila zastupljena u ipsilateralnoj hemisferi (13.61 ± 2.72% za dan 4, 10.38 ± 3.62% za dan 8) nego na kontralateralnoj (3.51 ± 2.92% za dan 4, 0.63 ± 0.27% za dan 8) (**Slika 32E**). Ovakvi rezultati pokazali su da je nakon moždanog udara izražaj receptora CD68 pretežito ko-lokaliziran u stanicama mikroglije s izražajem TLR2. S druge strane, samo manji dio stanica mikroglije pozitivnih na TLR2 je istovremeno izražavao receptor CD68. Također, udio TLR2<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> fenotipa mikroglije imao je pozitivnu korelaciju s neurološkim deficitom izmjerenim 8 dana nakon tMCAO ( $R = 0.61$ ,  $P = 0.044$ ), ukazujući na njegovu štetnu ulogu u funkcionalnom oporavku nakon moždanog udara (**Slika 32F**).



**Slika 32:** Rezultati protočne citometrije za analizu izražaj receptora CD68 i TLR2 na stanicama mikroglije miševa Wt(Tlr2-luc) prije i nakon izazivanja moždanog udara. **A)** Strategija razvrstavanja stanica s prikazom različitih fenotipova mikroglije. Udio pojedinih fenotipova je izračunat za sveukupnu mikrogliju, uključujući populacije mirujuće i aktivirane mikroglije. Udio mikroglije koji izražava fenotip TLR2<sup>-</sup>CD68<sup>-</sup> (**B**), TLR2<sup>+</sup>CD68<sup>-</sup> (**C**), TLR2<sup>-</sup>CD68<sup>+</sup> (**D**) i TLR2<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> (**E**). Svi grafikoni osim (**D**) imaju istu skalu na Y-osi. # - značajno u odnosu na bazalne vrijednosti, \* - značajna razlika između hemisfera, + - značajna razlika između vremenskih točaka; #/\*/+ -  $P < 0.050$ , ##/\*\*/++ -  $P < 0.010$ , ###/\*\*\*/+++ -  $P < 0.001$ , dobiveno dvosmjernim ANOVA testom za neponovljena mjerenja uz *post-hoc* analizu prema Tukey-u. **F)** Korelacije između neurološkog deficita i udjela TLR2<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> mikroglije u cjelokupnom mozgu miševa Wt(Tlr2-luc) izoliranom 8 dana nakon tMCAO. Punom crtom označen je pravac linearne regresije, dok isprekidane krivulje predstavljaju 95%-tni interval pouzdanosti. Za korelaciju napisana je jednadžba pravca linearne regresije, Pearsonov koeficijent korelacije i statistička značajnost korelacije.

Nakon moždanog udara dominirala je zasebna populacija mikroglije koja je izražavala samo receptor TLR2 bez izražaja CD68 (TLR2<sup>+</sup>CD68<sup>-</sup>), a znatno povećanje udjela ovog fenotipa mikroglije uočeno je i na kontralateralnoj hemisferi. S obzirom da je receptor CD68 povezan isključivo s pro-upalnim procesima posredovanim M1 fenotipom mikroglije (142) ovi rezultati bi mogli ukazivati na dvojak u ulogu receptora TLR2 i na različit učinak pojedinih fenotipova mikroglije na patofiziološke procese u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara. Stoga je izmjereno koliki udio TLR2<sup>+</sup> mikroglije istovremeno izražava receptor CD68 (**Tablica 9**). Najveći udio TLR2<sup>+</sup> mikroglije koja istovremeno izražava receptor CD68 bio je prisutan 4 dana nakon tMCAO, te se njezin udio značajno smanjio do 8. dana ( $P < 0.001$ ). Nadalje, ipsilateralna hemisfera je u obje vremenske točke imala veći udio TLR2<sup>+</sup> mikroglije koja istovremeno izražava receptor CD68 (**Tablica 9**).

**Tablica 9:** Rezultati procjene udjela TLR2<sup>+</sup> mikroglije koji istovremeno izražava receptor CD68 metodom protočne citometrije. Mozgovi miševa Wt(Tlr2-luc) izolirani su prije tMCAO te 4 i 8 dana nakon tMCAO. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. \* - značajna razlika između hemisfera. \* -  $P < 0.050$ , \*\* -  $P < 0.010$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ , dobiveno dvosmjernim ANOVA testom za neponovljena mjerenja uz *post-hoc* analizu prema Tukey-u.

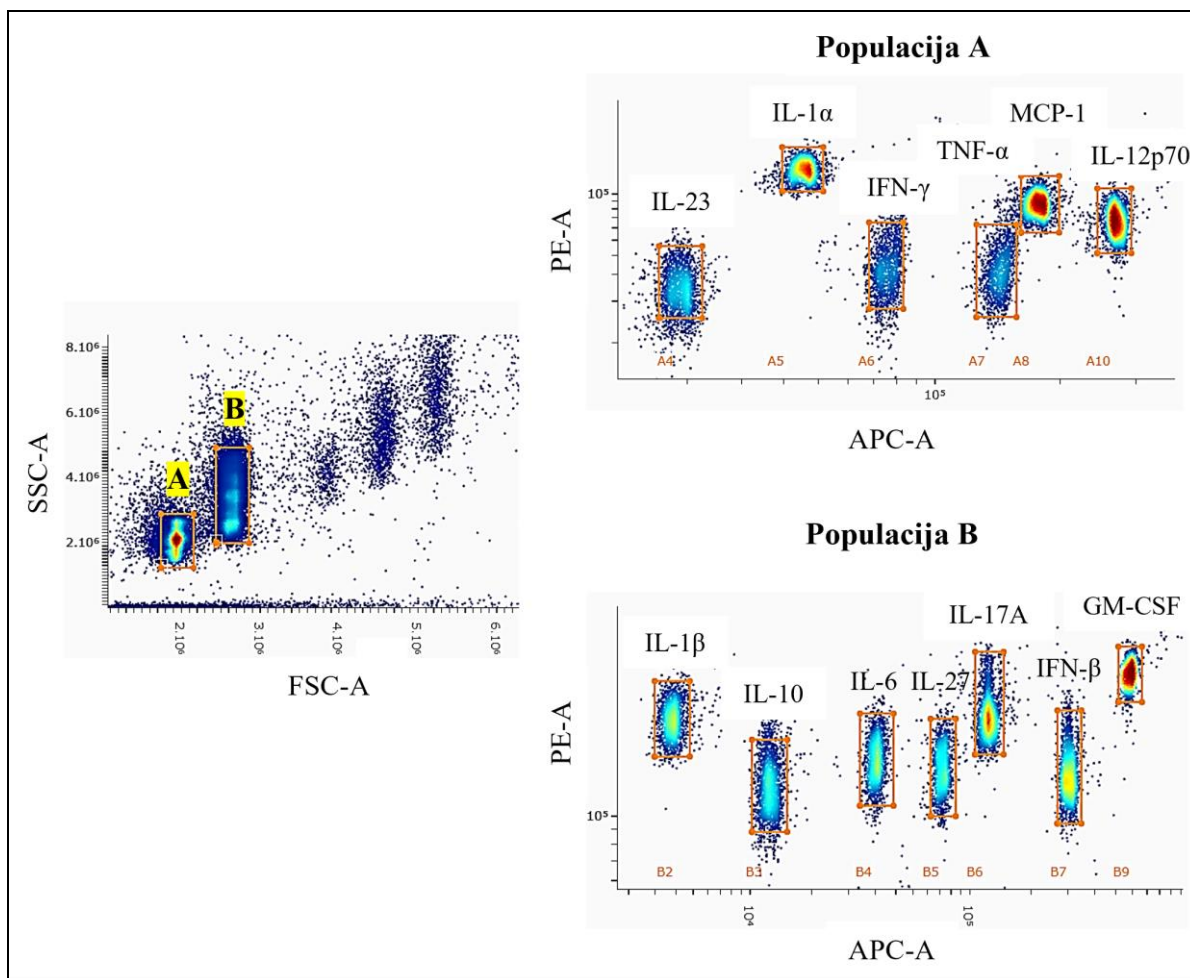
	Hemisfera		P vrijednost
	Ipsi	Kontra	
<b>Prije tMCAO</b>	4.99 ± 0.90%	3.80 ± 1.53%	0.994
<b>Dan 4</b>	20.62 ± 4.71%	13.06 ± 6.94%	***0.001
<b>Dan 8</b>	13.54 ± 1.60%	3.63 ± 1.60	***0.001

## **5.7. Nedostatak receptora TLR2 povećava koncentracije citokina u krvnoj plazmi nakon ishemijske ozljede mozga**

Nakon što je opisan proces upale u središnjem živčanom sustavu nakon moždanog udara, okarakterizirani su i biljezi upale prisutni u krvnoj plazmi kako bi se pokazao utjecaj receptora TLR2 na aktivaciju upalnih procesa u cijelom tijelu nakon moždanog udara. U tu svrhu je metodom višestruke ELISA reakcije određena koncentracija 13 citokina u krvnoj plazmi miševa u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara: IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, MCP-1 i TNF- $\alpha$ . Citokini su važni za reguliranje upalnog odgovora i komunikaciju između različitih upalnih stanica, a nakon moždanog udara njihova koncentracija se povećava u mozgu te u krvnoj plazmi (50). Također, pokazana je povezanost koncentracija mnogih citokina s ishodom moždanog udara (53, 56, 59, 62, 65).

### **5.7.1. Postavke protočne citometrije za analizu sustava LEGENDplex™**

Koncentracije citokina u krvnoj plazmi su određene sustavom LEGENDplex™ koji se temelji na višestrukoj ELISA reakciji, međutim rezultati se očitavaju protočnim citometrom. Stoga je za analizu koncentracija citokina bilo neophodno uspostaviti adekvatnu strategiju razvrstavanja kuglica sa zarobljavajućim antitijelima na protočnom citometru. Populacije kuglica su najprije odvojene na grafikonu direktnog i postraničnog raspršenja. Na tom grafikonu se po veličini razlikuju dvije populacije kuglica: populacija A koju čine kuglice manje veličine i populacija B sastavljena od većih kuglica (**Slika 33**). Zatim su obje populacije kuglica zasebno odvojene prema intenzitetu APC signala, s obzirom da se fluorescentna boja nalazila unutar kuglica. Populacija A imala je 6 sub-populacija koje su se razlikovale prema udjelu fluorescentne boje APC. Ovih 6 sub-populacija predstavljalo je 6 različitih citokina: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-12p70 IL-23, MCP-1 i TNF- $\alpha$ . Populacija B je također prema intenzitetu APC-posredovane fluorescencije odvojena na 7 sub-populacija koje su predstavljale citokine GM-CSF, IFN- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-17A i IL-27 (**Slika 33**). Nadalje, količina analita vezanih na kuglice sa zarobljavajućim antitijelima se odredila mjerenjem fluorescencije boje PE, s obzirom da je ona konjugirana na streptavidin koji je u ovom sustavu bio vezan na detekcijska antitijela konjugirana s biotinom. Za svaku sub-populaciju je određen medijan intenziteta fluorescencije u kanalu za PE, koji je odgovarao količini pojedinih analita vezanih za kuglice (**Slika 33**), tj. koncentraciji citokina u uzorku krvne plazme.



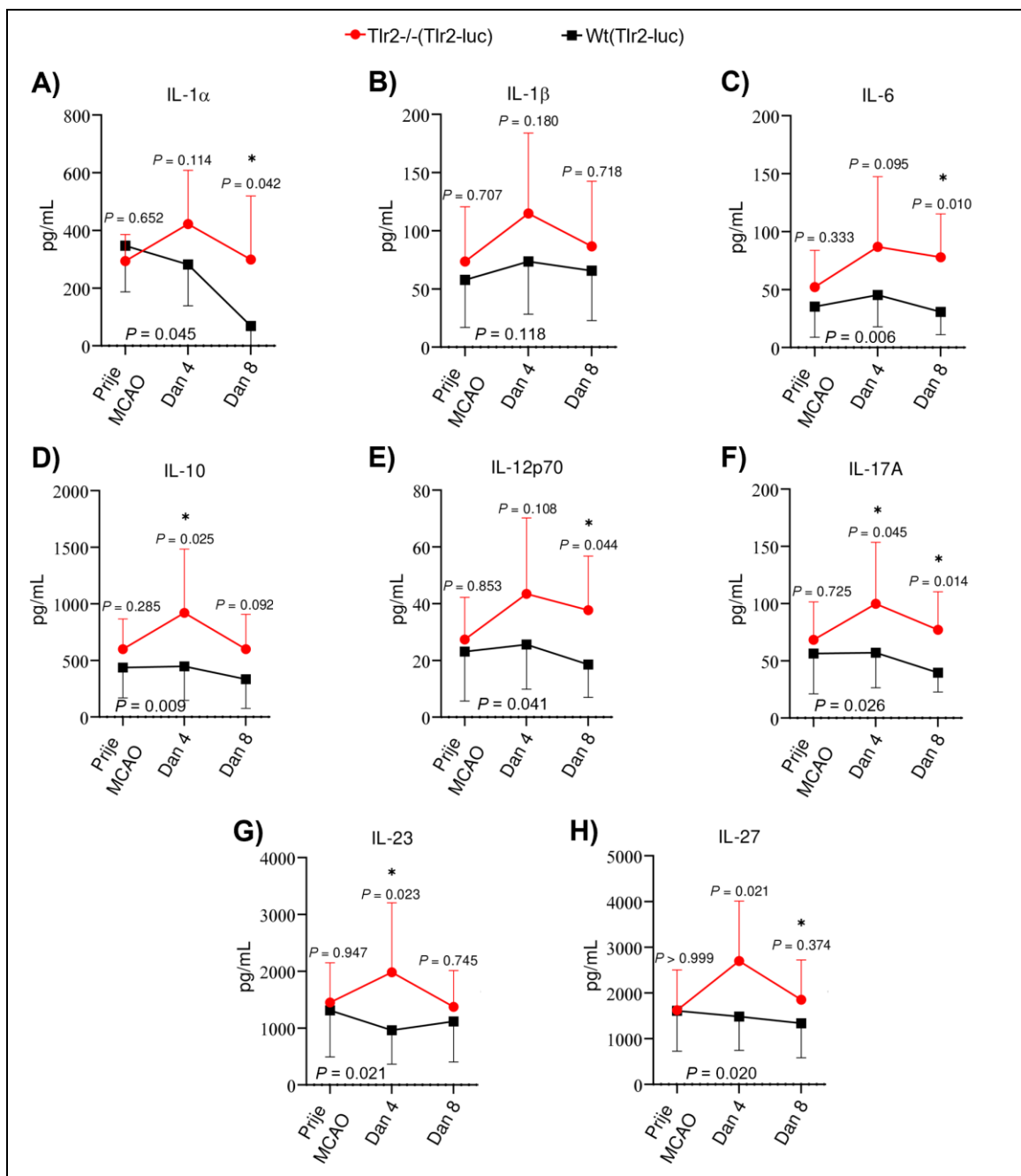
**Slika 33:** Strategija razvrstavanja kuglica na protočnom citometru prilikom propuštanja uzoraka pripremljenih kitom LEGENDplex™. Na grafikonu direktnog i postraničnog raspršenja su odvojene dvije populacije kuglica (A i B). Zatim je svaka populacija razdvojena prema količini signala u kanalu za APC i PE. Sub-populacije kuglica razdvojene u kanalu APC su predstavljale različite analite, a intenzitet fluorescentnog signala u kanalu za PE je bio mjera koncentracije pojedinih analita u uzorku.

### 5.7.2. Moždani udar povećava koncentracije citokina u krvnoj plazmi

U ovom istraživanju miševi su bili podvrgnuti opetovanom vađenju krvi prije tMCAO te 4 i 8 dana nakon zahvata što je omogućilo longitudinalno praćenje promjena koncentracije citokina u krvnoj plazmi. Najprije su određene koncentracije 6 pro-upalnih interleukina: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p70, IL-17A, IL-23 i IL-27. Kod soja Tlr2 $^{-/-}$ (Tlr2-luc) došlo je do povećanja svih promatranih pro-upalnih interleukina 4 dana nakon tMCAO, dok povećanje nije bilo prisutno kod životinja Wt(Tlr2-luc). Miševi Tlr2 $^{-/-}$ (Tlr2-luc) su imali značajno povećane koncentracije

pro-upalnih interleukina IL-1 $\alpha$  ( $P = 0.045$ ), IL-12p70 ( $P = 0.041$ ), IL-17A ( $P = 0.026$ ), IL-23 ( $P = 0.021$ ) i IL-27 ( $P = 0.020$ ) nakon moždanog udara u odnosu na miševе Wt(Tlr2-luc) (**Slika 34**). Jedino za IL-1 $\beta$  nije bilo razlike između sojeva ( $P = 0.118$ ). Statistički značajno povećanje koncentracije citokina u krvnoj plazmi miševa Tlr2-/(Tlr2-luc) nakon moždanog udara je bilo prisutno 4 (IL-23 i IL-27) i 8 (IL-1 $\alpha$ , IL-12p70) dana nakon tMCAO u odnosu na soj Wt(Tlr2-luc), ovisno o vrsti interleukina. Najveća razlika između sojeva je uočena za IL-17A koji je bio povišen kod miševa Tlr2-/(Tlr2-luc) 4 ( $99.74 \pm 53.76$  pg/mL za Tlr2-/(Tlr2-luc),  $57.03 \pm 30.58$  pg/mL za Wt(Tlr2-luc);  $P = 0.045$ ) i 8 dana ( $76.97 \pm 33.28$  pg/mL za Tlr2-/(Tlr2-luc),  $39.52 \pm 16.81$  pg/mL za Wt(Tlr2-luc);  $P = 0.014$ ) nakon moždanog udara (**Slika 34F**). Iako je prethodnim rezultatima pokazano da nedostatak receptora TLR2 dovodi do smanjenog upalnog odgovora posredovanog mikroglijom, koncentracije pro-upalnih interleukina u krvnoj plazmi su bile povećane u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara uslijed nedostatka receptora TLR2. Paradoksalno, došlo je i povećanja protektivnog interleukina IL-27 ukazujući na dvojaku ulogu receptora TLR2 u procesima upale nakon moždanog udara. Nisu uočene statistički značajne razlike između sojeva u koncentraciji pro-upalnih interleukina prije izazivanja moždanog udara.

Zatim su određene koncentracije anti-upalnih interleukina IL-6 i IL-10 u krvnoj plazmi miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2-/(Tlr2-luc). Koncentracije IL-6 i IL-10 u krvnoj plazmi nakon moždanog udara su bile znatno veće kod miševa Tlr2-/(Tlr2-luc) u odnosu na soj Wt(Tlr2-luc) (Tlr2-/(Tlr2-luc) vs Wt(Tlr2-luc):  $P = 0.006$  za IL-6 i  $P = 0.009$  za IL-10) (**Slika 34C**). Za IL-6 najveća razlika između sojeva je bila prisutna 8 dana nakon tMCAO ( $77.82 \pm 37.47$  pg/mL za Tlr2-/(Tlr2-luc),  $30.71 \pm 19.61$  pg/mL za Wt(Tlr2-luc);  $P = 0.010$ ), dok je za IL-10 najveća razlika uočena na dan 4 ( $919.20 \pm 564.50$  pg/mL za Tlr2-/(Tlr2-luc),  $446.90 \pm 300.30$  pg/mL za Wt(Tlr2-luc);  $P = 0.025$ ) (**Slika 34D**). Nedostatak receptora TLR2 je doveo do povećanja koncentracija anti-upalnih interleukina u krvnoj plazmi miševa tijekom akutne i sub-akutne faze moždanog udara.

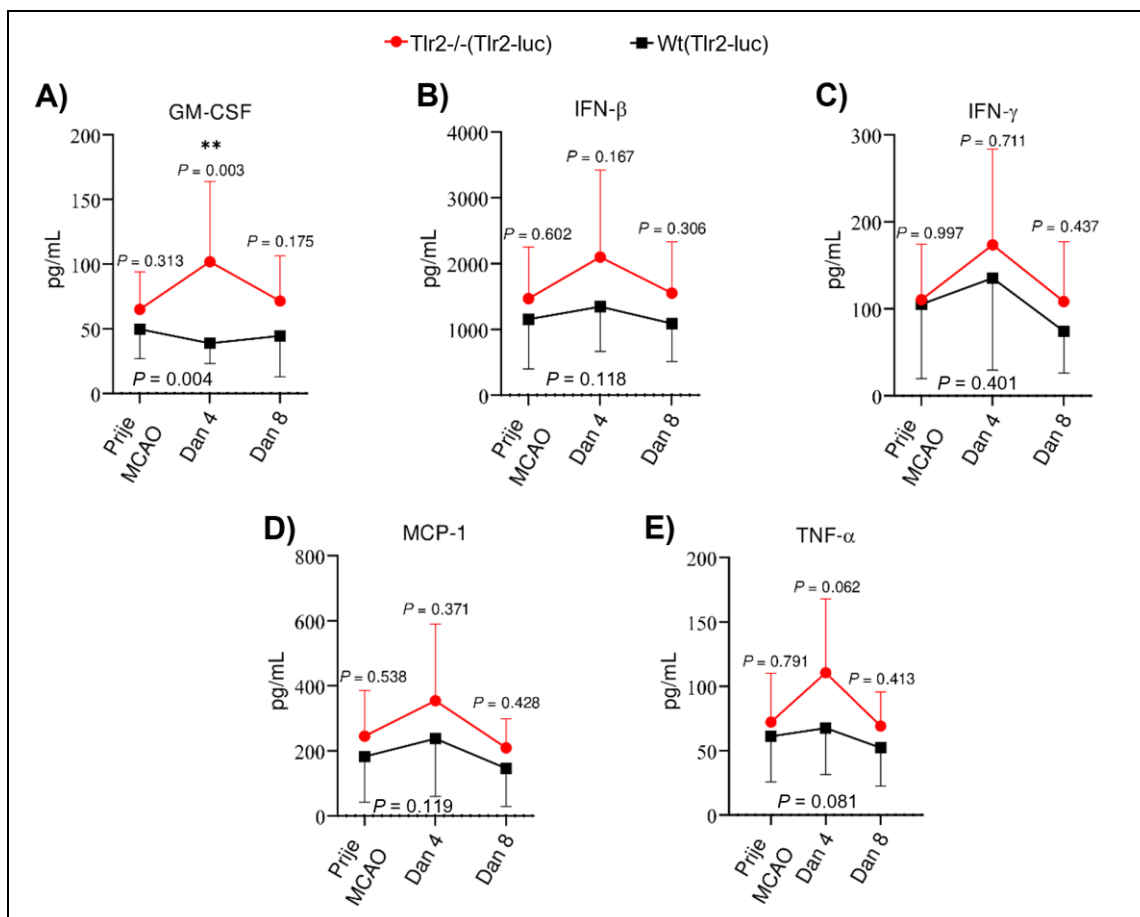


**Slika 34:** Koncentracije interleukina IL-1 $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C), IL-10 (D), IL-12p70 (E), IL-17A (F), IL-23 (G) i IL-27 (H) u krvnoj plazmi miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) prije izazivanja ishemijske ozljede mozga te 4 i 8 dana nakon tMCAO. Nedostatak receptora TLR2 doveo je do povećanja koncentracija interleukina u krvnoj plazmi miševa podvrgnutih tMCAO zahvatu. Koncentracije interleukina su izmjerene metodom višestruke ELISA reakcije korištenjem kita LEGENDplex™. \* - značajna razlika između sojeva; \* -  $P < 0.050$ , \*\* -  $P < 0.010$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ , dobiveno dvosmjernim ANOVA testom za ponovljena mjerenja s *post-hoc* korekcijom prema Sidaku.



Nadalje, analizirane su koncentracije interferona IFN- $\beta$  i IFN- $\gamma$  u krvnoj plazmi miševa Wt(Tlr2-luc) i Tlr2-/(Tlr2-luc). Međutim, nakon moždanog udara nije uočena razlika između sojeva u koncentracijama IFN- $\beta$  i IFN- $\gamma$  u krvnoj plazmi miševa (**Slika 35**). Nedostatak receptora TLR2 nije značajno utjecao na koncentracije interleukina u krvnoj plazmi. Na kraju su analizirane koncentracije kemokina GM-CSF i MCP-1 te citokina TNF- $\alpha$ . Miševi Tlr2-/(Tlr2-luc) su nakon moždanog udara imali značajno veću koncentraciju GM-CSF u krvnoj plazmi u odnosu na miševe Wt(Tlr2-luc) ( $P = 0.004$ ), a najveća razlika je bila prisutna 4 dana nakon tMCAO ( $101.80 \pm 62.16$  pg/mL za Tlr2-/(Tlr2-luc),  $38.69 \pm 15.49$  pg/mL za Wt(Tlr2-luc);  $P = 0.003$ ) (**Slika 35A**). Nedostatak receptora TLR2 rezultirao je povećanjem koncentracije protektivnog kemokina GM-CSF u krvnoj plazmi miševa tijekom akutne faze moždanog udara. Nakon moždanog udara došlo je do povećanja koncentracije MCP-1 i TNF- $\alpha$  u krvnoj plazmi miševa, međutim nisu bile prisutne statistički značajne razlike između sojeva Wt(Tlr2-luc) i Tlr2-/(Tlr2-luc) (**Slika 35**).

Sveukupno gledajući, rezultati višestruke ELISA reakcije su pokazali da nedostatak receptora TLR2 mijenja izražaj nekih citokina u krvnoj plazmi miševa nakon moždanog udara. Nakon inhibicije receptora TLR2 je došlo do povećanja pro-upalnih kao i anti-upalnih citokina u krvnoj plazmi ukazujući na kompleksnu dvojaku ulogu receptora TLR2 u regulaciji procesa upale nakon moždanog udara. Ovakvi rezultati su upućivali na promijenjenu dinamiku upalnih procesa u krvi u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara uzrokovanu nedostatkom receptora TLR2.



**Slika 35:** Koncentracije citokina GM-CSF (A), IFN-β (B), IFN-γ (C), MCP-1 (D) i TNF-α (E) u krvnoj plazmi Wt(Tlr2-luc) i Tlr2-/(Tlr2-luc) miševa prije izazivanja ishemijske ozljede mozga te 4 i 8 dana nakon tMCAO. Koncentracije interleukina su izmjerene metodom višestruke ELISA reakcije korištenjem kita LEGENDplex™. \* - značajna razlika između sojeva; \* -  $P < 0.050$ , \*\* -  $P < 0.010$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ , dobiveno dvosmjernim ANOVA testom za ponovljena mjerenja s *post-hoc* korekcijom prema Sidaku.

## 6. RASPRAVA

Glavni cilj ove disertacije bio je odrediti obilježja i vremensku dinamiku upale posredovane receptorom TLR2 nakon moždanog udara te definirati njihovu povezanost s volumenom ishemijske lezije kod miševa. Ovim istraživanjem pokazano je da nedostatak receptora TLR2 mijenja dinamiku upalnih procesa nakon moždanog udara kod miševa, tj. nedostatak receptora TLR2 doveo je do bržeg smanjenja upale u mozgu nakon moždanog udara kod odraslih miševa. Nadalje, izražaj gena *Tlr2*, mjeren *in vivo* bioluminiscencijom, pokazao se kao pouzdan prediktor volumena ishemijske lezije, neovisno o prisutnosti samog receptora TLR2. Navedenim rezultatima postignut je glavni cilj istraživanja te je potvrđena hipoteza o povezanosti izražaja gena *Tlr2* s obilježjima i dinamikom upale nakon ishemijske ozljede mozga kod miševa. Također, pokazano je da nedostatak receptora TLR2 dovodi do bržeg funkcionalnog oporavka nakon moždanog udara. Prednost ovog istraživanja predstavljalo je korištenje multimodalnog oslikavanja mišjeg mozga nakon moždanog udara čime je omogućeno longitudinalno praćenje razvoja ishemijske lezije zajedno s upalnim procesima posredovanim receptorom TLR2. Rezultati *in vivo* snimanja bili su dodatno upotpunjeni testovima neurološkog deficita te molekularnim metodama analize upalnih biljega u mozgu. Osim upalnih procesa u središnjem živčanom sustavu, određen je i utjecaj receptora TLR2 na razine citokina u perifernoj krvi nakon moždanog udara. S obzirom da su upalni procesi nakon moždanog udara najviše izraženi u akutnoj i sub-akutnoj fazi, ovo istraživanje se fokusiralo na analizu upalnih biljega tijekom prvih 8 dana nakon moždanog udara.

## 6.1. Nova transgenična mišja linija pouzdan je model za praćenje upale posredovane TLR2 receptorom *in vivo* bioluminiscencijom

Novo-dobivena mišja linija potvrđena je kao dobar model za proučavanje izražaja *Tlr2* gena u životinjama bez funkcionalnog proteina TLR2. Metodama imunohistokemije i protočne citometrije potvrđen je nedostatak receptora TLR2, a izražaj luciferaze u mišjem mozgu dokazan je *in vitro* imunohistokemijom te *in vivo* snimanjem bioluminiscencije. Izražaj luciferaze na histološkim presjecima mišjeg mozga bio je prisutan samo u stanicama mikroglije, što je u skladu s prethodnim istraživanjima koja su pokazala specifičnu ko-lokalizaciju receptora TLR2 s biljezima mikroglije (80, 81). Slični obrazac izražaja luciferaze dobiven je i za kontrolnu skupinu miševa s funkcionalnim receptorom TLR2 ukazujući da nedostatak receptora TLR2 nije uzrokovao dodatnu aktivaciju promotora gena *Tlr2* u ostalim stanicama središnjeg živčanog sustava. Također, u kontrolnoj skupini fluorescentni signal receptora TLR2 u potpunosti je ko-lokalizirao sa signalom luciferaze. Time je potvrđeno da se izražaj luciferaze doista može koristiti kao molekularni biljeg izražaja receptora TLR2. Ovakvi rezultati bili su u skladu s prethodnim istraživanjem koje je dizajniralo i okarakteriziralo mišju liniju C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri/Gaj</sup>. U tom istraživanju nisu korištena antitijela za luciferazu, ali je receptor TLR2 na histološkim presjecima mišjeg mozga ko-lokaliziran s GFP-om, koji se u ovoj transgeničnoj mišjoj liniji izražava zajedno s luciferazom (81). Karakterizacija mišje linije C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri/Gaj</sup> primjenom antitijela za luciferazu je dodatno upotpunila prethodno istraživanje.

Snimanje *in vivo* bioluminiscencije omogućava longitudinalno praćenje izražaja gena od interesa te je ova metoda primijenjena u mnogobrojnim pretkliničkim istraživanjima moždanog udara (119, 121, 124, 125). Razvijena je transgenična mišja linija koja pod promotorom gena *Tlr2* izražava luciferazu te služi kao molekularni biljeg izražaja gena *Tlr2* (81). Prethodna istraživanja pokazala su da je izražaj gena *Tlr2* praćen metodom *in vivo* bioluminiscencije pouzdan model za procjenu intenziteta upale posredovane mikroglijom nakon moždanog udara kod miševa (81, 122, 123). Međutim, ova strategija je primijenjena isključivo za praćenje upalnih procesa nakon moždanog udara u miševa divljeg tipa, a mišje linije s nedostatkom funkcionalnog receptora TLR2 i istovremenim izražajem transgena *Tlr2-luc/gfp* do sada nisu bile dostupne. Stoga je za potrebe ovog istraživanja dizajnirana i napravljena nova mišja linija Tlr2<sup>-/-</sup>(Tlr2-luc) koja uz nedostatak receptora TLR2 izražava luciferazu pod kontrolom promotora gena *Tlr2*. Ovakav pristup je omogućio longitudinalno praćenje upalnih procesa

posredovanih genom *Tlr2* uz odsutnost funkcionalnog receptora TLR2, tj. analizu posljedica nedostatka receptora TLR2 na aktivnost vlastitog promotora i posljedičnih upalnih procesa. Promotor gena *Tlr2* ostaje aktivan unatoč nedostatku funkcionalnog receptora TLR2 (82), te je u ovom mišjem modelu *Tlr2*<sup>-/-</sup>(*Tlr2*-luc) pokretao izražaj luciferaze. Usporedbom s već opisanom linijom miševa *Wt*(*Tlr2*-luc) definirane su vremenske promjene aktivnosti promotora gena *Tlr2* nakon moždanog udara uslijed nedostatka funkcionalnog receptora TLR2 te su povezane s ishodom moždanog udara.

Izražaj i aktivnost luciferaze dodatno su potvrđeni snimanjem *in vivo* bioluminiscencije. Prije izazivanja ishemijske lezije bioluminiscentni signal kod *Tlr2*<sup>-/-</sup>(*Tlr2*-luc) miševa bio je nešto manji u odnosu na životinje s funkcionalnim receptorom TLR2. S obzirom da unatoč nedostatku receptora TLR2 nije došlo do povećanja aktivnosti gena *Tlr2*, rezultati su ukazivali da prije izazivanja ishemijske lezije nije prisutna kompenzacija nedostatka receptora TLR2 pomoću prekomjerne aktivacije promotora gena. Do sličnog zaključka došlo je i prethodno istraživanje u kojem je primijenjena metoda qPCR za praćenje izražaja gena *Tlr2* uz nedostatak funkcionalnog receptora (82). Autori su zaključili da aktivnost gena *Tlr2* ne ovisi o prisutnosti samog proteinskog produkta, već o izražaju komponenata nizvodnog signalnog puta receptora TLR2: *Myd88*, *Irak1*, *Irak3*, *Irak4*, *Ikkb*β (inhibitor κB kinaze β, engl. *inhibitor of κB kinase β*), *Tollip* (protein koji veže toll, engl. *toll interacting protein*), *Tnf-α*, *Il-6* i *Casp8* (kaspaza 8). Životinje s nedostatkom receptora TLR2 imaju smanjeni izražaj navedenih gena signalne kaskade prije izazivanja ishemijske ozljede mozga te posljedično smanjeni bazalni izražaja gena *Tlr2* (82), što je u skladu s rezultatima karakterizacije nove mišje *Tlr2*<sup>-/-</sup>(*Tlr2*-luc) linije opisane u ovoj disertaciji. Miševi korišteni u navedenom istraživanju su imali istu vrstu nedostatka receptora TLR2 kao i miševi primijenjeni u ovoj disertaciji, štoviše isti soj je korišten za parenja prilikom dobivanja i kasnije uzgoja nove *Tlr2*<sup>-/-</sup>(*Tlr2*-luc) linije opisane u ovoj disertaciji. Miševima ove linije nedostaje dio gena *Tlr2* koji kodira za izvanstaničnu, transmembransku i dio unutarstanične domene receptora TLR2. Promotor gena *Tlr2* nije uklonjen te je pokazana transkripcija skraćene mRNA koja ne daje funkcionalni proteinski produkt, ali svejedno se može koristiti za procjenu aktivnosti promotora gena *Tlr2* metodom qPCR kod miševa s nedostatkom funkcionalnog receptora TLR2 (82). Ovakav nedostatak funkcionalnog receptora TLR2 uz očuvan promotor gena *Tlr2* se pokazao kao dobar model za promatranje upalnih procesa u mozgu posredovanih genom *Tlr2* nakon izazivanja moždanog udara kod miševa (82). Isti princip praćenja aktivnosti promotora gena *Tlr2* primijenjen je i u ovom istraživanju, s time da je ugradnja bioluminiscentnog molekularnog biljega pod

kontrolom promotora gena *Tlr2* omogućila primjenu metode *in vivo* bioluminiscencije umjesto qPCR-a. Prednost ovog pristupa bila je mogućnost longitudinalnog praćenja izražaja gena *Tlr2*, što je uz procjenu jačine upalnog odgovora, omogućilo praćenje vremenske dinamike i određivanje postotka smanjenja upale posredovane receptorom TLR2 nakon moždanog udara. Nadalje, primjena metoda longitudinalnog multimodalnog oslikavanja mišjeg mozga nakon moždanog udara omogućila je simultano određivanje i povezivanje volumena ishemijske lezije s upalnim procesima posredovanim receptorom TLR2.

Osim za istraživanja moždanog udara, novo-dobivena *Tlr2*<sup>-/-</sup>(*Tlr2*-luc) mišja linija bi se mogla primijeniti u budućim istraživanjima koja proučavaju upalne procese u mozgu povezane s infekcijama ili neurodegenerativnim bolestima. Također, praćenje upalnih procesa na ovom modelu korištenjem *in vivo* bioluminiscencije može se u budućim istraživanjima upotrijebiti za procjenu efikasnosti novih terapijskih pristupa kojima je cilj moduliranje upalnih procesa u središnjem živčanom sustavu.

## 6.2. Primjena *in vivo* bioluminiscencije za longitudinalno praćenje upalnog odgovora nakon moždanog udara

S obzirom da receptor TLR2 ima ključnu ulogu u pokretanju procesa upale (79, 80), u ovoj disertaciji detaljno su proučene posljedice njegovog nedostatka na upalne procese u miševa nakon moždanog udara. Povećanje izražaja gena *Tlr2* nakon moždanog udara mjereno *in vivo* bioluminiscencijom uočeno je u ipsilateralnoj i kontralateralnoj hemisferi, neovisno o prisutnosti funkcionalnog receptora TLR2. Ovakav rezultat upućuje da aktivacija upalnog odgovora nakon moždanog udara nije strogo specifična samo za hemisferu zahvaćenu lezijom već se aktivira u cijelom mozgu tijekom akutne faze. Međutim, pokazano je da miševi s nedostatkom receptora TLR2 imaju manji izražaj gena *Tlr2* nakon moždanog udara u odnosu na *Wt(Tlr2-luc)* miševe, ukazujući na manji opseg upale. Nakon moždanog udara kod miševa s ne-funkcionalnim receptorom TLR2 svejedno dolazi do povećanja aktivnosti promotora gena *Tlr2* u odnosu na bazalne vrijednosti. Ovakva opažanja ukazuju da se nedostatak receptora TLR2 nakon moždanog udara pokušava kompenzirati prekomjernom aktivacijom promotora gena, dok ista kompenzacija nije bila prisutna prije izazivanja ishemijske lezije. Kao rezultat kompenzacije koja se odražava prekomjernom aktivacijom promotora, miševi bez funkcionalnog receptora TLR2 su inicijalno, 2 dana nakon moždanog udara, imali izražaj gena *Tlr2* usporediv s *Wt(Tlr2-luc)* životinjama. Međutim, u kasnijim vremenskim točkama kompenzacija više nije bila prisutna što je rezultiralo bržom stopom smanjenja upale posredovane genom *Tlr2* u odnosu na životinje s funkcionalnim receptorom TLR2. Veći postotak smanjenja upale bio je prisutan na ipsilateralnoj i na kontralateralnoj hemisferi. Dobiveni rezultati su bili u skladu s prethodnim istraživanjem koje je metodom qPCR pokazalo smanjenu aktivaciju promotora gena *Tlr2* nakon moždanog udara kod miševa s nedostatkom receptora TLR2 (82). U tom radu se također značajno povećala aktivnost promotora nakon ishemije u odnosu na bazalne vrijednosti kod *Tlr2*<sup>-/-</sup> miševa, a pokazana je aktivacija promotora na ipsilateralnoj i kontralateralnoj hemisferi (82). Ovo istraživanje nadopunilo je prethodno opisane rezultate jer je odredilo dinamiku smanjenja upale posredovane genom *Tlr2*. Zaključeno je da je aktivacija upalnog odgovora slabija uslijed nedostatka receptora TLR2, a istovremeno je smanjenja intenziteta upale nakon moždanog udara brže.

Vremenska dinamika aktivacije gena *Tlr2* nije se promijenila nedostatkom proteinskog produkta, oba soja miševa imala su najveći signal 2 dana nakon izazivanja ishemijske lezije te se intenzitet postepeno smanjio do 7. dana. Ovakva dinamika izražaja gena *Tlr2* bila je u skladu

s prethodnim istraživanjem koje je *in vivo* bioluminiscencijom pratilo miševe divljeg tipa. Izražaj gena *Tlr2* kod miševa s funkcionalnim receptorom TLR2 ostao je značajno povišen u odnosu na lažno operirane životinje i do 3 mjeseca nakon moždanog udara (81). Isti učinak bio je vidljiv u ovom istraživanju gdje su miševi s funkcionalnim receptorom TLR2 imali povećanu bioluminiscenciju 7 dana nakon moždanog udara u odnosu na bazalne vrijednosti. Za razliku od njih, miševi bez funkcionalnog receptora TLR2 na istoj su vremenskoj točki imali bioluminiscenciju usporedivu s bazalnim vrijednostima. Nedostatak receptora TLR2 je do kraja sub-akutne faze moždanog udara doveo do utišavanja upalnog odgovora posredovanog genom *Tlr2*, dok kod miševa s funkcionalnim receptorom TLR2 aktivnost upalnih procesa posredovanih genom *Tlr2* perzistira tijekom kronične faze moždanog udara (81). Ovakvi podaci bili su u skladu s većim postotkom smanjenja upale posredovane genom *Tlr2* kod miševa s nedostatkom receptora TLR2.

Metodom *in vivo* bioluminiscencije praćen je izražaj gena *Tlr2* isključivo na razini izražaja mRNA. Kako bi se potvrdilo da su dobiveni rezultati ujedno i dobar prediktor izražaja proteina TLR2, napravljeni su dodatni pokusi na miševima s funkcionalnim receptorom TLR2. Izražaj receptora TLR2 u mozgu tih miševa kvantificiran je metodom protočne citometrije. Kada su uspoređeni rezultati dobiveni protočnom citometrijom s rezultatima *in vivo* bioluminiscencije za istu grupu Wt(*Tlr2*-luc) miševa, uočena je konzistencija u rezultatima. Time je još jednom potvrđeno da je luciferaza dobar molekularni biljeg izražaja receptora TLR2. Nadalje, protočna citometrija pokazala je najveći izražaj receptora TLR2 na stanicama mikroglije, međutim manji dio izražaja bio je prisutan i na ostalim ne-imunološkim stanicama središnjeg živčanog sustava. Imunohistokemijom je pokazana ko-lokalizacija luciferaze, kao molekularnog biljega izražaja receptora TLR2, isključivo s biljezima mikroglije, a nije uočena ko-lokalizacije luciferaze s astrocitima. Na prvi pogled ove dvije metode su pokazale oprečne rezultate, međutim izražaj receptora TLR2 na ne-imunološkim stanicama središnjeg živčanog sustava bio je izrazito mali. S obzirom da je metoda protočne citometrije mnogo osjetljivija po pitanju razine detekcije, imunohistokemijom nije bilo moguće vizualizirati tako malu količinu proteina. Ovakvi rezultati bili su u skladu s prethodnim istraživanjima, koja su metodom qPCR pokazala izražaj mRNA gena *Tlr2* u stanicama astrocita i oligodendrocita, ali imunohistokemijskim bojenjem izražaj proteina TLR2 je dokazan isključivo za stanice mikroglije (79, 80, 81).



### 6.3. Signali koje prenosi TLR2 moduliraju ishemijsko oštećenje kod miševa

Dobiveni rezultati pokazali su da nedostatak receptora TLR2 dovodi do razvoja veće ishemijske lezije i do izraženijeg edema u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara. Edem je uzrokovao značajno povećanje volumena ipsilateralne hemisfere nakon moždanog udara kod miševa s nedostatkom receptora TLR2. Nadalje, kao posljedica većeg edema, bilo je potrebno dulje vremensko razdoblje za povlačenje edema, stoga je gubitak ukupnog volumena tkiva mozga bio odgođen kod miševa bez funkcionalnog receptora TLR2. Odgoda gubitka tkiva mozga nakon moždanog udara uslijed nedostatka receptora TLR2 već je opisana u literaturi (80). Međutim, ovaj proces je povezan s većim gubitkom tkiva kod miševa s nedostatkom receptora TLR2 u kroničnoj fazi moždanog udara zajedno s povećanom aktivacijom procesa apoptoze (80, 88). Moguće je da su navedena zbivanja posljedica izraženijeg edema u akutnoj fazi, s obzirom da edem ima citotoksični učinak na stanice. Osim odgode povlačenja edema, nedostatak receptora TLR2 doveo je do većeg T2 signala na MRI snimkama 7 dana nakon moždanog udara, upućujući na veću količinu vode u samom tkivu lezije. Ovakvi rezultati bili su u skladu s većim volumenom ipsilateralne hemisfere kod miševa s nedostatkom receptora TLR2, kao i s izraženijim indeksom edema.

Veća ishemijska lezija kod miševa s nedostatkom receptora TLR2 uočena je tek u manjem broju prethodnih istraživanja (80, 87), dok su ostala pokazala manju ishemijsku leziju u akutnoj fazi moždanog udara za miševe s onemogućenim receptorom TLR2 (79, 83 - 86). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem nisu bili u skladu s većinom prethodnih spoznaja, s obzirom da su miševi s nedostatkom receptora TLR2 razvili veće ishemijske lezije u akutnoj fazi moždanog udara. Razlog ovih odstupanja leži u metodologiji određivanja volumena ishemijske lezije. Navedene prethodne studije su za procjenu volumena ishemijske lezije koristile isključivo histološke metode, dok uzastopno *in vivo* snimanje lezije nije bilo uvršteno u njihove pokuse. Posljedično, volumen ishemijske lezije procijenjena je isključivo za životinje koje su doživjele kraj pokusa, a rezultati za životinje uginule prije kraja pokusa nedostaju. S obzirom da je u ovom istraživanju korištena metoda MRI za snimanje i procjenu volumena lezije, prikazani podaci su sadržavali životinje koje su doživjele kraj pokusa, kao i one koje su uginule. Nadalje, u prethodnim istraživanjima volumen ishemijske lezije nije longitudinalno praćen, već je za svaku vremensku točku korištena zasebna eksperimentalna skupina. Stoga ovo istraživanje upotpunjuje prijašnja saznanja. Zapravo, do sada je objavljeno samo jedno istraživanje koje je longitudinalno pratilo volumen ishemijske lezije kod miševa s nedostatkom receptora TLR2, ali nije uočen značajan

utjecaj receptora TLR2 na volumen ishemijske lezije u akutnoj fazi moždanog udara (88). Stoga se ukazuje potreba za daljnjom primjenom metoda *in vivo* oslikavanja za longitudinalno praćenje razvoja volumena ishemijske lezije. Dobiveni rezultati bili su u skladu s još ne objavljenim istraživanjem naše istraživačke skupine koje je također longitudinalno pratilo veličinu ishemijske lezije MRI-em, a pokazuje nešto veću ishemijsku leziju u akutnoj i sub-akutnoj fazi kod miševa s nedostatkom receptora TLR2, uz veći gubitak tkiva u kroničnoj fazi moždanog udara.

Unatoč razvoju veće ishemijske lezije uslijed nedostatka receptora TLR2, nisu uočene razlike u stopi preživljenja u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara. Gledajući trend preživljenja, miševi bez funkcionalnog receptora TLR2 imali su nešto manje preživljenje, ali nije dobivena statistička značajnost. Ovakvi podaci su u skladu s prethodnim istraživanjem koje također pokazuje da nedostatak receptora TLR2 ne mijenja preživljenje (87), a do istog zaključka je došlo i već spomenuto ne objavljeno istraživanje naše istraživačke skupine.

Fokusiranjem isključivo na volumen ishemijske lezije može se zaključiti da receptor TLR2 ima protektivnu ulogu u akutnoj fazi moždanog udara. Međutim, kada se uz volumen lezije usporede i rezultati neurološkog deficita, utjecaj receptora TLR2 na ishod moždanog udara više nije toliko očigledan. Nedostatak receptora TLR2 nije pogoršao neurološki deficit u akutnoj fazi moždanog udara usprkos razvoju veće ishemijske lezije, a nije uočena niti razlika u preživljenju. Jedini parametar koji je ukazivao na nešto lošije stanje miševa s nedostatkom receptora TLR2 bila je sporija kompenzacija gubitka tjelesne mase nakon moždanog udara. Prijašnji podaci o utjecaju receptora TLR2 na neurološki deficit nakon moždanog udara su veoma oskudni. U dva istraživanja nije uočen utjecaj receptora TLR2 na neurološki deficit nakon moždanog udara (87, 88), dok je jedno istraživanje pokazalo manju ishemijsku leziju uz smanjeni neurološki deficit u akutnoj fazi moždanog udara kod miševa s nedostatkom receptora TLR2 (86). Glavni problem kod procjene neurološkog deficita predstavlja činjenica da nedostaju standardizirani protokoli napravljeni specifično za pretklinička istraživanja moždanog udara na mišjem modelu. Posljedično, protokoli i podaci iz različitih studija su veoma heterogeni te ih je teško međusobno usporediti. Novitet ovog istraživanja je određivanje postotka smanjenja neurološkog deficita nakon moždanog udara koji je bio izraženiji kod miševa s nedostatkom funkcionalnog receptora TLR2, upućujući na njihov bolji oporavak nakon moždanog udara. Ovakvi rezultati pokazuju da je, sveukupno gledajući, u ovom

istraživanju receptor TLR2 imao štetnu ulogu u akutnoj i sub-akutnoj fazi nakon moždanog udara kod miševa.

U prijašnjim istraživanjima koja su radila procjenu neurološkog deficita i volumena ishemijske lezije nakon moždanog udara nije pokazana korelacija ova dva parametra. Nedostatak navedenih istraživanja je korištenje oskudnog protokola za procjenu neurološkog deficita koji je imao jednu ili tek nekoliko procjenskih kategorija (86, 87). Samo je jedno istraživanje primijenilo opsežniji protokol za procjenu neurološkog deficita kod miševa, međutim nije napravljena korelacija s volumenom ishemijske lezije (88). Protokol za procjenu neurološkog deficita korišten u ovom istraživanju pokazao se kao dobar i pouzdan prediktor volumena ishemijske lezije u cijeloj akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara. Povećanjem volumena ishemijske lezije proporcionalno se povećavao i neurološki deficit, neovisno o prisutnosti funkcionalnog receptora TLR2. Dokazivanje korelacije između volumena ishemijske lezije i neurološkog deficita za sve promatrane vremenske točke omogućilo je prilagođavanje neurološkog deficita prema volumenu lezije. Pokazano je da su miševi s nedostatkom receptora TLR2 imali značajno manji neurološki deficit prilagođen prema volumenu ishemijske lezije, te je istovremeno ovako prilagođeni deficit imao veću stopu smanjenja do kraja sub-akutne faze u odnosu na miševe s funkcionalnim receptorom TLR2. Ovakvi rezultati upućuju na štetnu ulogu receptora TLR2 na neurološki deficit u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara. Miševi s nedostatkom receptora TLR2 bili su zaštićeni od razvoja velikog neurološkog oštećenja u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara te su imali brži oporavak. Budući da je nedostatak receptora TLR2 istovremeno bio povezan sa smanjenim upalnim odgovorom nakon moždanog udara, moguće je da smanjenje upalnih procesa pozitivno utječe na stopu smanjenja neurološkog deficita.

#### **6.4. Multimodalnim pristupom u pretkliničkom istraživanju moždanog udara pokazana je povezanost upale i ishemijskog oštećenja**

Glavni cilj ovog istraživanja bio je povezati upalne procese posredovane receptorom TLR2 s volumenom ishemijske lezije i neurološkim deficitom u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara. Primjena i kombiniranje različitih metoda *in vivo* snimanja mišjeg mozga omogućila je simultano prikupljanje sva tri parametra za istu eksperimentalnu skupinu životinja te longitudinalno praćenje njihove vremenske progresije. Korištenjem višestruke linearne i logističke regresije pokazano je da su sva 3 parametra međusobno povezana te su promjene u 2 parametra znatno utjecale na varijancu trećeg parametra. Međutim, uočene su poneke razlike u korelaciji kada su analizirani podaci zasebno za divlji tip i miševe s nedostatkom receptora TLR2.

Pokazano je da volumen ishemijske lezije pozitivno korelira s izražajem promotora gena *Tlr2* mjenjenog metodom *in vivo* bioluminiscencije, neovisno o prisutnosti samog receptora. Ovakvi rezultati opaženi su 2 i 4 dana nakon moždanog udara, dok 7. dan nije bilo korelacije. Time se intenzitet upale u ranoj akutnoj fazi ishemijske lezije pokazano kao dobar prediktor volumena ishemijske lezije. Ako se pogleda vremenska dinamika razvoja ishemijske lezije te aktivnosti gena *Tlr2*, uočeno da oba soja miševa 7 dana nakon ishemijske lezije imaju dosta izraženu leziju, dok se intenzitet upale posredovane genom *Tlr2* smanjio gotovo na bazalnu razinu. Moguće je da zbog ovih razlika nije bila prisutna korelacija između veličine lezije i aktivnosti gena *Tlr2* 7 dana nakon tMCAO. Linearnom regresijom je pokazano da volumen lezije značajno utječe na jačinu upalnog odgovora mjenjenog bioluminiscencijom te objašnjava 17.8% varijance. Također, volumen ishemijske lezije je predvidio 9.8% varijance u stopi smanjenja upale mjenjene bioluminiscencijom čime se dodatno potvrdila poveznica ishemijskog oštećenja i upale.

Osim s volumenom ishemijske lezije, jačina upale korelirala je i s neurološkim oštećenjem. Logističkom regresijom je pokazano da se povećanjem bioluminiscencije, tj. povećanjem upale posredovane genom *Tlr2* povećavalo se neurološko oštećenje nakon moždanog udara. Međutim, jačina upale mjenjena *in vivo* bioluminiscencijom se nije pokazala kao pouzdan prediktor neurološkog oštećenja tijekom cijele akutne i sub-akutne faze moždanog udara. Korelacija ova dva parametra mijenjala se ovisno o vremenskoj točki nakon ishemijske lezije te o prisutnosti funkcionalnog receptora TLR2. Slično dinamici razvoja ishemijske lezije,

neurološki deficit bio je najveći 2 dana nakon tMCAO te se postepeno smanjio do 7. dana, a oba soja miševa su svejedno imala značajni deficit na kraju pokusa. U ranoj akutnoj fazi, dva dana nakon tMCAO, kada je bio vrhunac upale posredovane genom *Tlr2* i najveće neurološko oštećenje, nije uočena značajna korelacija ovih parametara. Najbolja korelacija bioluminiscencije i neurološkog deficita dobivena je 4 dana nakon tMCAO kada su oba soja imala umjereni Pearsonov koeficijent korelacije. Na dan 7 uočena je visoka korelacija između bioluminiscencije i neurološkog oštećenja, ali samo za miševe s nedostatkom receptora TLR2. Također, u svim promatranim vremenskim točkama povećanjem intenziteta upale posredovane genom *Tlr2* istovremeno se povećao neurološki deficit.

Gledajući zajedno korelacije intenziteta upale s neurološkim oštećenjem i volumenom ishemijske lezije, može se zaključiti da je povećanje neurološkog deficita i volumena lezije udruženo s većom aktivacijom upalnih procesa posredovanih genom *Tlr2* u akutnoj i subakutnoj fazi moždanog udara. Nadalje, linearnom regresijom dodatno je pokazano da se povećanjem intenziteta upalnih procesa usporava neurološki oporavak kod oba soja.

Ovo nije bilo prvo istraživanje koje je promatralo korelaciju volumena ishemijske lezije i patofiziološkog procesa nakon moždanog udara kod miševa. Pokazano je da volumen ishemijske lezije ima pozitivnu korelaciju s biljegom oporavka aksona te s biljegom apoptoze, a oba parametra su mjerena metodom *in vivo* bioluminiscencije (88). Sveukupno gledajući, prethodno istraživanje zajedno s rezultatima ovog istraživanja ukazuje na veliki potencijal *in vivo* bioluminiscencije za promatranje i dokazivanje korelacije između raznih patofizioloških procesa s ishodom moždanog udara kod miševa. Prednost ovog pristupa je činjenica da su razvijene i opisane mnoge transgenične mišje linije koje izražavaju luciferazu pod kontrolom promotora gena relevantnih za procese ishemijske kaskade (88, 119, 120, 121, 125). Nadalje, razvijeni su i raznovrsni zatočeni bioluminiscentni supstrati koji omogućavaju proučavanje specifičnih molekularnih zbivanja u tkivu (143, 144).

Prethodna istraživanja pokazuju smanjenu aktivaciju biljega upale nakon moždanog udara kod miševa s nedostatkom receptora TLR2 (80, 82, 85). S obzirom da nije korišten multimodalni pristup, procjena volumena ishemijske lezije i izražaja biljega upale nisu napravljeni na istim životinjama. Stoga su autori prepostavili da je smanjenje upalnih biljega kod miševa s nedostatkom receptora TLR2 direktna posljedica manje ishemijske lezije. Međutim, ovo istraživanje pokazalo je suprotan učinak. Miševi s nedostatkom receptora TLR2 imali su veću ishemijsku leziju udruženu s manjim upalnim odgovorom posredovanim aktivacijom gena *Tlr2*.

Ovi rezultati su dodatno potvrđeni korigiranjem bioluminiscentnog signala za volumen ishemijske lezije čime je pokazano da su miševi s nedostatkom receptora TLR2 imali manju aktivaciju upale posredovane genom *Tlr2* po volumenu ishemijske lezije. Također, miševi s nedostatkom receptora TLR2 imali su značajno manji intenzitet bioluminiscentnog signala korigiranog za vrijednosti neurološkog deficita. Nadalje, upalni procesi korigirani za volumen ishemijske lezije i neurološki deficit su imali veći postotak smanjenja u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara kod miševa s nedostatkom funkcionalnog receptora TLR2. Gledajući sveukupne procese nakon moždanog udara uključujući volumen ishemijske lezije, neurološko oštećenje i jačinu upale posredovane genom *Tlr2*, nedostatak funkcionalnog receptora TLR2 doveo je do razvoja veće ishemijske lezije u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara. Međutim, istovremeno su atenuirane negativne posljedice razvoja veće ishemijske lezije. Nedostatak receptora TLR2 nije promijenio preživljenje miševa nakon moždanog udara, a bio je povezan s većim postotkom smanjenja neurološkog deficita i upale u središnjem živčanom sustavu u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara. Dakle, sveukupni rezultati su upućivali na štetnu ulogu receptora TLR2 na ishod moždanog udara u akutnoj i sub-akutnoj fazi.

## **6.5. Utjecaj TLR2 na nakupljanje limfocita u mozgu nakon ishemijske ozljede**

Metodom protočne citometrije proučavano je nakupljanje limfocita u tkivu mozga miševa nakon moždanog udara. Nakupljanje limfocita nakon moždanog udara bilo je prisutno isključivo kod životinja s funkcionalnim receptorom TLR2, a najveća količina limfocita zabilježena je 8 dana nakon tMCAO. Ovakvi rezultati upućuju da su miševi s nedostatkom receptora TLR2 na neki način bili zaštićeni od ulaska limfocita nakon moždanog udara. Leukocitoza je jedan od glavnih biljega upale središnjeg živčanog sustava nakon moždanog udara. Leukociti uzrokuju sekundarna oštećenja izlučivanjem pro-upalnih faktora, ROS-ova, proteaza i MMP-ova koji dodatno oštećuju endotelne stanice čime se narušava integritet krvno-moždane barijere (145). Međutim, u kroničnoj fazi limfociti utišavaju upalne procese proizvodnjom anti-upalnih čimbenika (145). Istovremeno, miševi bez funkcionalnog receptora TLR2 su imali veću stopu smanjenja neurološkog deficita što je bilo u skladu s prethodnim istraživanjem koje povezuje infiltraciju limfocita s većim neurološkim deficitom nakon moždanog udara (146). Jedan od mogućih razloga za ovakvu opservaciju su razlike u oštećenju krvno-moždane barijere. Ne postoje radovi koji su proučavali utjecaj receptora TLR2 na propusnost krvno-moždane barijere nakon ishemijske ozljede, međutim istraživanje koje je proučavalo intracerebralnu hemoragiju pokazuje da se nedostatkom receptora TLR2 smanjuje oštećenje krvno-moždane barijere (147). Moguće je da su isti mehanizmi zaštite kod miševa s nedostatkom receptora TLR2 aktivni i nakon ishemijskog moždanog udara. Posljedično, miševi s nedostatkom receptora TLR2 bi imali manje oštećenje krvno-moždane barijere što je rezultiralo nemogućnošću infiltracije limfocita u tkivo mozga nakon moždanog udara. Drugo objašnjenje za ovakav rezultat je potencijalna ključna uloga receptora TLR2 u procesu ulaska limfocita u tkivo mozga. Pokazan je izražaj receptora TLR2 na endotelnim stanicama krvnih žila u mozgu te na infiltrirajućim imunskim stanicama, uključujući i limfocite (68). Proučavanjem traumatske ozljede entorinalne moždane kore uočeno je smanjeno nakupljanje limfocita kod miševa s nedostatkom receptora TLR2 (148), a aktivacija ovog mehanizma nakon moždanog udara mogla bi objasniti dobivene razlike između sojeva u nakupljanju limfocita u tkivu mozga.

## **6.6. Nedostatak receptora TLR2 smanjuje aktivaciju mikroglije nakon moždanog udara**

Nakon moždanog udara udio populacije aktivirane mikroglije i makrofaga (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>visoki</sup>) se povećao isključivo na ipsilateralnoj hemisferi, a sukladno se smanjio udio mirujuće mikroglije (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>srednji</sup>) kod oba soja. Miševi s nedostatkom receptora TLR2 imali su povećani udio aktivirane mikroglije 4 dana nakon tMCAO u odnosu na miševe divljeg tipa. Međutim, do 8. dana došlo je do značajnog smanjenja te više nije bila prisutna razlika između sojeva. Uz ove rezultate, miševi s funkcionalnim receptorom TLR2 su imali smanjeni udio mirujuće mikroglije na dan 8. Ovakvi podaci su ukazivali da nedostatak receptora TLR2 inicijalno povećava aktivaciju mikroglije nakon moždanog udara, međutim u kasnijim vremenskim točkama dolazi do bržeg smanjenja aktivacije mikroglije. Povećanje udjela aktivirane mikroglije kod miševa s nedostatkom receptora TLR2 bilo je u skladu s uočenim većim volumenom ishemijske lezije u akutnoj fazi moždanog udara. Isto tako, udio aktivirane mikroglije imao je pozitivnu korelaciju s volumenom ishemijske lezije, dok je mirujuća mikroglija pokazivala negativnu korelaciju. Ove korelacije dobivene su neovisno o prisutnosti funkcionalnog receptora TLR2, a uočene su isključivo 4 dana nakon tMCAO kada je udio aktivirane mikroglije bio značajno povećan kod oba soja u odnosu na bazalne vrijednosti.

Glavna karakteristika upalnih procesa nakon moždanog udara je aktivacija mikroglije. Aktivirana mikroglija ima sposobnost fagocitoze čime uklanja ostatke oštećenih stanica te proizvodi citokine i MMP, a posljedično dolazi do oštećenja krvno-moždane barijere. Za razliku od nje, mirujuća mikroglija ima ramificirani oblik s malim tijelom stanice i mnogobrojnim citoplazmatskim ograncima te ne izlučuje štetne faktore (149, 150). Ipak, pokazano je da aktivirana mikroglija ima dvojak u ulogu nakon moždanog udara. Smanjenje aktivacije mikroglije u ranoj akutnoj fazi moždanog udara rezultira smanjenim volumenom lezije, međutim druga istraživanja su isti proces povezala s povećanom apoptozom neurona (151, 152). S obzirom da je TLR2 jedan od glavnih receptora odgovornih za aktivaciju mikroglije nakon moždanog udara, za očekivati je da će nedostatak TLR2 promijeniti aktivaciju mikroglije.

Aktivacija mikroglije dodatno je okarakterizirana putem biljega fagocitoze receptora CD68. U ovom istraživanju izražaj receptora CD68 praćen je metodama protočne citometrije i imunohistokemije. Dinamika izražaja CD68 bila je slična kao u prethodnom istraživanju, receptor je bio prisutan tijekom svih 8 dana nakon moždanog udara, a izražaj je bio veći kod



miševa s funkcionalnim receptorom TLR2. Ovakvi rezultati upućuju da nedostatak receptora TLR2 rezultira smanjenom aktivacijom pro-upalnog M1 fenotipa mikroglije u akutnoj fazi moždanog udara. Pred kraj akutne faze nije došlo do smanjenja izražaja receptora CD68, ukazujući da bi CD68 mogao biti potencijalni biljeg upale i u kroničnoj fazi moždanog udara.

Protein CD68 je membranski receptor, a nalazi se na membrani lizosoma i na staničnoj membrani (153). Ukoliko na staničnoj membrani dođe do prekomjernog izražaja CD68 endocitozom se uklanja višak receptora CD68 sa stanične membrane te se pomoću endosomalnih vezikula prenesu na membranu lizosoma. Time se omogućava precizna regulacija izražaja CD68 na površini stanice i recikliranje receptora bez nepotrebne degradacije samog proteina (153). CD68 je najviše izražen na stanicama mijeloidne linije te se koristi kao biljeg prisutnosti upalnih procesa posredovanih mikroglijom i makrofagima (142). Ne zna se koja je točno uloga ovog receptora u upalnim procesima, međutim postoje dokazi da je povezan s procesom fagocitoze. Također, CD68 je jedan od biljega pro-upalnog fenotipa mikroglije M1 nakon moždanog udara (154, 156). Prethodno istraživanje pokazalo je povećanje izražaja CD68 kod miševa s funkcionalnim receptorom TLR2, a aktivacija je prisutna tijekom cijele akutne faze (80). Trenutno neobjavljeni rezultati naše istraživačke skupine pokazuju povećani izražaj CD68 na ipsilateralnoj hemisferi 28 dana nakon moždanog udara. Ovakvi podaci indiciraju kako je CD68 dobar pokazatelj prisutnosti upalnih procesa u mozgu u svim fazama moždanog udara te bi se u budućim istraživanjima mogao koristiti kao molekularni biljeg upale središnjeg živčanog sustava.

Miševi s funkcionalnim receptorom TLR2 su 7 dana nakon moždanog udara imali izraženiji gubitak volumena tkiva mozga u odnosu na miševe s nedostatkom receptora TLR2. Ovaj proces može biti posljedica povećanog izražaja CD68 kod miševa s funkcionalnim receptorom TLR2, s obzirom na poveznicu CD68 s fagocitozom (154). Moguće je da su miševi s funkcionalnim receptorom TLR2 nakon moždanog udara imali veću aktivaciju fagocitoze posredovane stanicama mikroglije, što je rezultiralo ranijim uklanjanjem oštećenih stanica i posljedično smanjenjem volumena mozga 7 dana nakon tMCAO. Za razliku od njih, miševi s onemogućenim receptorom TLR2 nisu imali toliko izražen proces fagocitoze u akutnoj fazi moždanog udara, što je dovelo do odgode smanjenja volumena mozga u sub-akutnoj fazi moždanog udara. Prema prethodnim istraživanjima, kod miševa s onemogućenim receptorom TLR2 smanjenje volumena mozga vidljivo je tek u kroničnoj fazi moždanog udara (80).

Protočnom citometrijom pokazano je značajno povećanje izražaja receptora CD68 na ipsilateralnoj kao i na kontralateralnoj hemisferi, neovisno o prisutnosti receptora TLR2. Nadalje, pokazano je da CD68 nije lokaliziran isključivo u mjestu ishemijske lezije. CD68 bio je izražen po cijeloj ipsilateralnoj hemisferi, dok je signal u kontralateralnoj hemisferi bio slabiji. Ovakvi rezultati, zajedno s izražajem gena *Tlr2* u kontralateralnoj hemisferi, ukazuju da upala nakon moždanog udara nije strogo ograničena na područje lezije, već je u smanjenom intenzitetu prisutna u cijelom mozgu. Imunohistokemijom je znatno povećanje signala receptora CD68 nakon moždanog bilo zabilježeno u regiji hipokampusa, a signal se povećao na ipsilateralnoj i na kontralateralnoj hemisferi. Time je ukazana potencijalna uloga hipokampusa u procesima upale nakon moždanog udara. Također, nedostatak receptora TLR2 doveo je do utišavanja izražaja CD68 u hipokampusu.

Kako bi se razjasnila uloga receptora TLR2 u upalnim procesima nakon moždanog udara, proučavana je ko-lokalizacija receptora TLR2 i CD68 kod miševa divljeg tipa. Receptor CD68 je nakon moždanog udara u potpunosti ko-lokalizirao s TLR2. Za razliku od njega, receptor TLR2 je u većini mikroglije bio izražen zasebno od CD68. Ovakvi rezultati upućuju da je samo manji dio izražaja receptora TLR2 povezan s procesom fagocitoze i pro-upalnim M1 fenotipom mikroglije nakon moždanog udara. S obzirom da je prethodnim istraživanjima već pokazana dvojaka uloga receptora TLR2 na ishod moždanog udara (80, 88), moguće je da fenotip mikroglije CD68<sup>-</sup>TLR2<sup>+</sup> ima drugačiju ulogu u post-ishemijskim procesima. Daljnjim istraživanjem trebalo bi provjeriti ko-lokalizaciju receptora TLR2 s biljezima anti-upalnog fenotipa mikroglije M2. Nadalje, ko-lokalizacija CD68 i TLR2 bila je prisutna gotovo isključivo u ipsilateralnoj hemisferi te je perzistirala tijekom cijele akutne faze. S druge strane, na kontralateralnoj hemisferi je, uz fenotip mirujuće mikroglije (CD68<sup>-</sup>TLR2<sup>-</sup>), prevladavao fenotip CD68<sup>-</sup>TLR2<sup>+</sup>, upućujući na smanjenu aktivaciju M1 fenotipa mikroglije na kontralateralnoj hemisferi.

## 6.7. Povezanost upalnih čimbenika s funkcionalnim oporavkom nakon moždanog udara

Klinička istraživanja povezuju dugotrajnu i intenzivnu aktivaciju upalnih procesa u akutnoj fazi moždanog udara s većom smrtnošću i većim neurološkim oštećenjima u kroničnoj fazi ishemije. Ukupni broj bijelih krvnih stanica, specifično neutrofila i limfocita te koncentracija reaktivnog proteina C (CRP, engl. *C reactive protein*) u krvi identificirani su kao glavni prediktori neurološkog ishoda nakon moždanog udara (157, 158). Sukladno navedenim istraživanjima, upalni procesi u mozgu nakon moždanog udara su u ovom istraživanju korelirali s neurološkim oštećenjem kod miševa. Međutim, nisu svi biljezi upale bili pouzdan prediktor za sve vremenske točke, a uočene su i razlike uzrokovane prisutnošću ili nedostatkom funkcionalnog receptora TLR2. U ranoj akutnoj fazi nije uočena korelacija između neurološkog deficita i upalnih procesa posredovanih genom *Tlr2*. Međutim, u sub-akutnoj fazi intenzitet upale pokazao kao dobar prediktor neurološkog oštećenja. Općenito gledajući, miševi sa smanjenim izražajem upalnih biljega u mozgu mjerenih *in vivo* bioluminiscencijom i protočnom citometrijom pokazivali su manji neurološki deficit. Izražaj gena *Tlr2* pokazao se kao pouzdan prediktor za procjenu neurološkog oštećenja 4 dana nakon moždanog udara kada se intenzitet oba parametra ponešto smanjio. Osam dana nakon moždanog udara izražaj receptora TLR2 i ko-lokalizacija TLR2 s CD68 na stanicama mikroglije pokazani su kao dobri pokazatelji neurološkog deficita. Oba receptora bila su povećano izražena na ipsilateralnoj i na kontralateralnoj hemisferi, a korelacija je uočena jedino kada se promatrao izražaj u cjelokupnom mozgu. Kod miševa s nedostatkom receptora TLR2 biljeg fenotipa mikroglije M1, CD68, pokazao se kao dobar prediktor neurološkog deficita 8 dana nakon tMCAO. S druge strane, miševi s funkcionalnim receptorom TLR2 nisu pokazali korelaciju između izražaja CD68 i neurološkog deficita. Kod njih je puno bolji prediktor bila razina ko-lokalizacije receptora CD68 i TLR2 unatoč činjenici da samo mali udio mikroglije pozitivne na CD68 istovremeno nije izražavao receptor TLR2. Također, kod Wt(*Tlr2-luc*) miševa se izražaj receptora TLR2 pokazao kao dobar prediktor neurološkog oštećenja u sub-akutnoj fazi moždanog udara. Sveukupno gledajući, promatrani biljezi upale u mozgu povezani su s pogoršanjem neurološkog deficita u sub-akutnoj fazi moždanog udara.

## 6.8. Povećanje upalnih biljega u perifernoj krvi nakon moždanog udara

Sveukupno gledajući, miševi s nedostatkom receptora TLR2 imali su povišene razine svih promatranih citokina u krvnoj plazmi 4 i 8 dana nakon tMCAO u odnosu na miševe divljeg tipa. Nadalje, većina promatranih citokina kod miševa s funkcionalnim receptorom TLR2 je nakon moždanog udara imala razine usporedive s bazalnim vrijednostima. Ovakvi rezultati mogu se objasniti činjenicom da se imunološki odgovor u krvi aktivira unutar nekoliko sati nakon moždanog udara te nakon 24h uslijedi imunodepresija, koja je kod pacijenata povezana s razvojem respiratornih i urinarnih infekcija nakon moždanog udara (41, 149). S obzirom da su u ovom istraživanju mjerene razine citokine tek 4 dana nakon tMCAO, moguće da se u tom periodu kod miševa s funkcionalnim receptorom TLR2 razina citokina već smanjila na bazalnu razinu, stoga nije bio detektiran vrhunac razine citokina u krvi. Međutim, naglo smanjenje upalnih procesa ne mora nužno imati pozitivan utjecaj na ishod moždanog udara s obzirom da se povećava mogućnost pojave imunodepresije i posljedičnih komplikacija (149). Čini se da su miševi s nedostatkom receptora TLR2 bili zaštićeni od imunodepresije jer su 4 i 8 dana nakon moždanog udara uočene povećane razine pro-upalnih i anti-upalnih citokina u krvnoj plazmi. Moguće je da kod njih tek kasnije, u kroničnoj fazi, dolazi do smanjenja razine citokina u krvnoj plazmi ili se razine citokina postepeno smanjuju tijekom sub-akutne i kronične faze moždanog udara.

Aktivacija receptora TLR2 pokreće signalni put koji direktno rezultira proizvodnjom pro-upalnih citokina TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  (78). Međutim, prethodna istraživanja moždanog udara pokazala su da inhibicija receptora TLR2 ne rezultira smanjenjem svih pro-upalnih citokina, upućujući na postojanje kompenzacijskih mehanizama koji pokreću proizvodnju pro-upalnih citokina usprkos nedostatku receptora TLR2 (80, 82). Miševi s nedostatkom receptora TLR2 imaju povišene razine IL-6 u mozgu nakon ishemije, dok se izražaj TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  ne mijenja (80, 82). Nadalje, povišene razine pro-upalnih citokina u mozgu perzistiraju i do mjesec dana nakon izazivanja moždanog udara (82). Rezultati višestruke ELISA reakcije bili su u skladu s navedenim podacima iz literature. Miševi s nedostatkom receptora TLR2 imali su povišene razine IL-6 u krvnoj plazmi, dok nije uočen utjecaj receptora TLR2 na promjenu koncentracija TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  nakon moždanog udara. Dodatno, usporedbom ovih rezultata s prethodnim istraživanjima pokazano je kako dinamika promjene razine citokina u krvnoj plazmi prati promjene citokina u mozgu. S obzirom da su do sada okarakterizirani citokini isključivo u

mozgu, ovim istraživanjem su proširena navedena saznanja proučavanjem razine citokina u krvnoj plazmi nakon moždanog udara.

Mnoga pretklinička i klinička istraživanja su povezala razine pojedinih citokina s volumenom ishemijske lezije i/ili neurološkim deficitom nakon moždanog udara. U skupinu pro-upalnih interleukina analiziranih metodom višestruke ELISA reakcije pripadalo je 6 analita: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p70, IL-17A, IL-23 i IL-27. Svi navedeni interleukini, osim IL-27, su u prethodnim istraživanjima povezani s većom ishemijskom lezijom i gorim neurološkim ishodom nakon moždanog udara (56, 159 - 161). Iako IL-27 pripada u skupinu pro-upalnih interleukina (162), pokazana je njegova protektivna uloga nakon moždanog udara. Tretman miševa s IL-27 uzrokuje razvoj manje ishemijske lezije i bolji funkcionalni oporavak nakon moždanog udara (163). Od analiziranih citokina, jedino je IL-10 pripadao u skupinu anti-upalnih interleukina. Međutim, istraživanja pokazuju da IL-6 može imati pro-upalnu i anti-upalnu funkciju, ovisno o tome na koji se stanični receptor veže (164). Povećane koncentracije interleukina IL-6 i IL-10 doprinose boljem ishodu nakon moždanog udara uzrokujući razvoj manje ishemijske lezije uz smanjeni neurološki deficit (59, 65). Interferoni imaju važnu ulogu u regulaciji urođenog imunološkog sustava te su pokretači aktivacije adaptivnog imunološkog odgovora (165). Glavni izvor IFN- $\beta$  i IFN- $\gamma$  u krvi su NK stanice. IFN- $\beta$  nakon moždanog udara ima protektivnu ulogu te dovodi do smanjenog upalnog odgovora posredovanog upalnim stanicama iz periferne krvi (166). S druge strane, IFN- $\gamma$  ima štetan utjecaj na ishod moždanog udara te zajedno s IL-17A doprinosi oštećenju krvno-moždane barijere nakon moždanog udara (167). GM-CSF je hematopoetski faktor rasta koji stimulira diferencijaciju progenitora u koštanoj srži u granulocite i makrofage. Također, odgovoran je za aktivaciju makrofaga, neutrofila i eozinofila te za sazrijevanje dendritičkih stanica. Makrofagi, endotelne stanice i limfociti T izlučuju GM-CSF kao odgovor na stimulaciju pro-upalnim citokinima IL-1 i TNF- $\alpha$  (168). Mnoga istraživanja dokazala su njegovu protektivnu ulogu u moždanom udaru (169). MCP-1 je odgovoran za infiltraciju limfocita i makrofaga u područje ishemijske lezije. Prethodna istraživanja pokazuju njegov dvojak utjecaj na ishod moždanog udara. Povećanje izražaja MCP-1 korelira s razvojem veće ishemijske lezije u akutnoj fazi (62), ali infiltracija monocita u područje lezije posredovana kemokinom MCP-1 ima neuroprotektivni učinak u kroničnoj fazi moždanog udara (63). Izlučivanje citokina TNF- $\alpha$  je direktno povezano s aktivacijom signalnog puta receptora TLR2, a TNF- $\alpha$  je ujedno i glavni pokretač proizvodnje ostalih pro-upalnih citokina nakon moždanog udara (78). Također, povezan je s razvojem veće ishemijske lezije (53).

Temeljnim tih studija, citokini proučavani u ovoj disertaciji mogu se podijeliti na neuroprotektivne (GM-CSF, IFN- $\beta$ , IL-6, IL-10 i IL-27), koji su povezani s razvojem manje ishemijske lezije i boljim neurološkim oporavkom, te na štetne za koje je dokazano da dovode do veće ishemijske lezije uz pogoršanje neurološkog deficita (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p70, IL-17A, IL-23, MCP-1 i TNF- $\alpha$ ). Miševi s nedostatkom receptora TLR2 su nakon moždanog udara imali povišene razine neuroprotektivnih citokina GM-CSF, IL-6, IL-10 i IL-27, kao i štetnih citokina IL-1 $\alpha$ , IL-12p70 i IL-17A, u odnosu na miševe divljeg tipa. Za citokine IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1 i TNF- $\alpha$  nije uočena razlika između sojeva. Povišene razine pro-upalnih citokina bile su u skladu s većom ishemijskom lezijom kod miševa s nedostatkom receptora TLR2, međutim nije došlo do pogoršanja neurološkog deficita. S druge strane, moguće je da su povećane razine anti-upalnih citokina pridonijele bržem neurološkom oporavku miševa s nedostatkom receptora TLR2. Sveukupno gledajući, nedostatak receptora TLR2 uzrokovao je znatne promjene u razinama pro-upalnih i anti-upalnih citokina u krvnoj plazmi nakon moždanog udara ukazujući da TLR2 ima utjecaj na upalne procese u cijelom tijelu, a ne samo u mozgu. Time je još jednom potvrđena kompleksna dvostruka uloga receptora TLR2 u upalnim procesima nakon moždanog udara kod miševa.

## 6.9. Prednosti primjene longitudinalnog pristupa u pretkličkim istraživanjima

Inovativnost eksperimentalnog dizajna opisanog u ovoj disertaciji temelji se na nekoliko čimbenika. Primjena ne-invazivnih metoda molekularnog oslikavanja omogućila je longitudinalno praćenje vremenske dinamike ishemijskog oštećenja. Također, stupnjevanje podataka u odnosu na bazalne vrijednosti i maksimalno oštećenje omogućilo je definiranje i praćenje parametara oporavka kao što su postotak smanjenja neurološkog deficita i postotak smanjenja upale. Unatoč činjenici da su neki tretmani već pokazali korelaciju s oporavkom, pretklička istraživanja moždanog udara nisu posvećena detaljnom proučavanju vremenske dinamike pojedinih procesa (170, 171). Nadalje, u ovom istraživanju kombinirane su metode *in vivo* snimanja razvoja ishemijske lezije pomoću magnetske rezonancije te snimanje upale *in vivo* bioluminiscencijom. Tim multimodalnim snimanjima omogućeno je simultano praćenje razvoja ishemijske lezije te upale koja nastaje kao posljedica same lezije. Iste životinje bile su podvrgnute preostalim neinvazivnim metodama kojima se procijenio neurološki deficit i odredila koncentracija citokina u krvnoj plazmi. U konačnici životinje su žrtvovane za potrebe stanične analize. Ovakav pristup omogućio nam je integrativno prikupljanje i procjenu raznovrsnih parametara oštećenja i oporavka, a istovremeno je smanjen broj životinja u eksperimentalnim skupinama, što je u skladu s 3R smjericama o korištenju životinja u eksperimentalne svrhe (172). Zatim, prilikom obrade podataka primijenjeno je statističko modeliranje metodama linearne i logističke regresije koje su omogućile pokazivanje poveznice između različitih parametara oštećenja i oporavka. Znatne varijabilnosti u volumenu lezije i anatomskom položaju uočene su nakon izazivanja ishemije metodom MCAO, što posljedično uzrokuje varijabilnosti u preostalim procesima aktiviranim nakon ishemije (173). Dokazivanje korelacije ujedno nam je omogućilo normaliziranje pojedinih podataka na jačinu oštećenja. Time su detaljnije analizirane posljedice nedostatka receptora TLR2, a neke razlike su ispoljene tek nakon prilagodbe parametara. Stoga, primjena longitudinalnog dizajna studije, multimodalno oslikavanje, statističko modeliranje i prilagodba parametara prema jačini oštećenja omogućila je integrativno proučavanje posljedica nedostatka receptora TLR2 na razvoj ishemijskog oštećenja i parametre oporavka nakon moždanog udara. Time je razvijen sustav prikupljanja i obrade podataka koji se može jednostavno implementirati u pretkličke studije čime bi se omogućilo detaljnije proučavanje utjecaja pojedinih terapija na ishod moždanog udara.

## 7. ZAKLJUČAK

Glavni zaključak ovog istraživanja glasi:

Nedostatak receptora TLR2 promijenio je vremensku dinamiku upalnog odgovora nakon ishemijske lezije uzrokujući brže smanjenje opsega upale, povezan je s razvojem veće ishemijske lezije, ali istovremeno pospješuje neurološki oporavak miševa.

Specifični zaključci ovog istraživanja su:

- 1) Novo-dobivena mišja linija C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kri/Gaj</sup>-Tlr2<sup>tm1-Kir/Gaj</sup> s bioluminiscentnim biljekom prikladna je za longitudinalno praćenje upale posredovane receptorom TLR2 nakon ishemijskog moždanog udara.
- 2) Nedostatak receptora TLR2 dovodi do bržeg smanjenja upale posredovane genom *Tlr2* u akutnoj (2 i 4 dana nakon tMCAO) i sub-akutnoj fazi (7 dana nakon tMCAO) moždanog udara.
- 3) Nedostatak receptora TLR2 uzrokuje nastanak veće ishemijske lezije, ali ne pogoršava preživljenje te doprinosi smanjenju neurološkog deficita u akutnoj i sub-akutnoj fazi moždanog udara.
- 4) Aktivacija mikroglije u akutnoj fazi moždanog udara povećana je u nedostatku receptora TLR2, ali je izražaj upalnih biljega mikroglije na kraju sub-akutne faze (8 dana nakon tMCAO) usporediv s bazalnim vrijednostima.
- 5) Smanjenje razina upalnih biljega u perifernoj krvi nakon moždanog udara odgođeno je nedostatkom receptora TLR2 te su povećane koncentracije citokina u krvi prisutne 4 i 8 dana nakon tMCAO.
- 6) Izražaj gena *Tlr2* mjeren *in vivo* bioluminiscencijom pozitivno korelira s volumenom ishemijske lezije i neurološkim deficitom nakon ishemijske ozljede, a nedostatak receptora TLR2 dovodi do smanjene aktivacije upalnog odgovora prilagođenog prema volumenu ishemijske lezije i neurološkom deficitu.



## 8. SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je okarakterizirati upalu posredovanu receptorom TLR2 te korelirati izražaj gena *Tlr2* s volumenom ishemijske lezije kod odraslih miševa.

Ishemijska lezija kod Wt(*Tlr2*-luc) i *Tlr2*<sup>-/-</sup>(*Tlr2*-luc) miševa bila je izazvana metodom tMCAO. Miševi su snimani MRI-em i BLI-em tijekom 7 dana nakon tMCAO kako bi se longitudinalno pratio razvoj ishemijske lezije te posljedični upalni odgovor. Rezultati snimanja upotpunjeni su procjenom neurološkog deficita, analizom upalnih biljega mikroglije te određivanjem razine citokina u krvnoj plazmi.

Aktivnost promotora gena *Tlr2* određena *in vivo* bioluminiscencijom pokazala se kao odličan model za praćenje intenziteta upalnog odgovora nakon moždanog udara. Nedostatak receptora TLR2 uzrokovao je nastanak veće ishemijske lezije i izraženiji edem, ali nije utjecao na preživljenje, doveo je do bržeg smanjenja upalnog odgovora te je potaknuo brži neurološki oporavak. Nadalje, volumen ishemijske lezije je pokazao pozitivnu korelaciju s neurološkim deficitom i jačinom upale, neovisno o prisutnosti receptora TLR2. Nedostatak receptora TLR2 smanjio je izražaj upalnih biljega mikroglije, a u krvi su povećane razine pro-upalnih i anti-upalnih citokina, ukazujući na njegovu dvojaku ulogu.

Sveukupno gledajući, ovo istraživanje je pokazalo kako je nedostatak receptora TLR2 promijenio dinamiku upalnih procesa nakon ishemijske ozljede mozga te pospješio neurološki oporavak u akutnoj fazi moždanog udara kod miševa.

## 9. SUMMARY

### Features of TLR2 receptor-mediated inflammation after ischemic lesion of mouse brain

Sanja Srakočić, 2023

The aim of this study was to characterize TLR2-mediated inflammation and correlate *Tlr2* gene expression with the volume of ischemic brain lesions in adult mice.

Ischemic lesions in Wt(*Tlr2-luc*) and *Tlr2*<sup>-/-</sup>(*Tlr2-luc*) mice were induced by the tMCAO method. Mice were imaged by MRI and BLI throughout 7 days after tMCAO to longitudinally monitor the progression of the ischemic lesion and the associated inflammation. Imaging results were complemented by neurological deficit assessment, analysis of microglial inflammation markers, and determining cytokine levels in blood plasma.

The activity of the *Tlr2* gene promoter, monitored by *in vivo* bioluminescence, proved to be a great model for monitoring inflammation intensity following a brain stroke. TLR2 deficiency caused the formation of a larger ischemic lesion and increased edema; however, survival was not affected. Inflammation reduction was quicker with more prominent neurological recovery. Additionally, the volume of the ischemic lesion positively correlated with the neurological deficit and the inflammation intensity, regardless of TLR2 presence. TLR2 deficiency caused a reduction in inflammatory microglial markers and increased levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in blood, indicating its dual role.

Overall, this research showed that TLR2 deficiency changed the dynamics of inflammatory processes after ischemic brain injury and facilitated neurological recovery in the acute phase of brain ischemia in mice.

## 10. POPIS LITERATURE

1. Hankey GJ. Stroke. *Lancet*. 2017;389(10069):641-654.
2. Campbell BC, Khatri P. Stroke. *Lancet*. 2020;396(10244):129-142.
3. GBD 2016 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurology*. 2019;18(5):439-458.
4. Rajšić S, Gothe H, Borba H, Sroczynski G, Vujičić J, Toell T, i sur. Economic burden of stroke: a systematic review on post-stroke care. *The European Journal of Health Economics*. 2019;20(1):107-13.
5. Xie X, Atkins E, Jicheng L, Bennett A, Neal B, Ninomiya T, i sur. Effects of intensive blood pressure lowering on cardiovascular and renal outcomes: updated systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2016;387(10017):435-443.
6. Raman G, Moorthy D, Hadar N, Dahabreh IJ, O'Donnell TF, Thaler DE, i sur. Management strategies for asymptomatic carotid stenosis: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*. 2013;158(9):676-685.
7. Qin C, Yang S, Chu YH, Zhang H, Pang XW, Chen L. Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduction and Target Therapy*. 2022;7(1)215.
8. Makris K, Haliassos A, Chondrogianni M, Tsivgoulis G. Blood biomarkers in ischemic stroke: potential role and challenges in clinical practice and research. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2018;55(5):294-328.
9. Brounsa R, De Deyna PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2009;111(6):483-495.
10. Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends in Neurosciences*. 1994;(6):251-257.
11. Brouns R, Sheorajpanday R, Wauters A, De Surgeloose D, Mariën P, De Deyn PP. Evaluation of lactate as a marker of metabolic stress and cause of secondary damage in acute ischemic stroke or TIA. *Clinica Chimica Acta*. 2008;397(1-2):27-31.
12. Guo S, Miyake M, Li KJ, Shi H. Specific inhibition of hypoxia inducible factor 1 exaggerates cell injury induced by in vitro ischemia through deteriorating cellular redox environment. *Journal of Neurochemistry*. 2009;108(5):91-97.
13. Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A

- perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Research Bulletin*. 1998;46(4):281-309.
14. Poh L, Kang SW, Baik SH, Ng GYQ, She DT, Balaganapathy P, i sur. Evidence that NLRC4 inflammasome mediates apoptotic and pyroptotic microglial death following ischemic stroke. *Brain, Behavior and Immunity*. 2019;(75):34-47.
  15. Kenny EM, Fidan E, Yang Q, Anthony Muthu TS, New LA, Meyer EA, i sur. Ferroptosis Contributes to Neuronal Death and Functional Outcome After Traumatic Brain Injury. *Critical Care Medicine*. 2019;47(3):410-418.
  16. Muoio V, Persson PB, Sendeski MM. The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiologica*. 2014;210(4):790-798.
  17. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2001;21(1):2-14.
  18. Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD i sur. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2005;289(2):558-568.
  19. Maida CD, Norrito RL, Daidone M, Tuttolomondo A, Pinto A. Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardioembolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(18):6454.
  20. Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *The Lancet Neurology*. 2016;15(8):869-881.
  21. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*. 2017;35:441-468.
  22. Lambertsen KL, Meldgaard M, Ladeby R, Finsen B. A quantitative study of microglial-macrophage synthesis of tumor necrosis factor during acute and late focal cerebral ischemia in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2005;25(1):119-135.
  23. Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci*. 2016;19(8):987-991.
  24. Xu S, Lu J, Shao A, Zhang JH, Zhang J. Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. *Frontiers in Immunology*. 2020;11(294).
  25. Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabin J, Fernandez-Cadenas I, Ribo M, Molina CA, i sur. Increased Brain Expression of Matrix Metalloproteinase-9 After Ischemic and Hemorrhagic Human Stroke. *Stroke*. 2006;37(6):1399-1406.

26. Maida CD, Norrito RL, Daidone M, Tuttolomondo A, Pinto A. Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardioembolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(18):6454.
27. Otxoa-de-Amezaga A, Miró-Mur F, Pedragosa J, Gallizioli M, Justicia C, Gaja-Capdevila N, i sur. Microglial cell loss after ischemic stroke favors brain neutrophil accumulation. *Acta Neuropathologica*. 2019;137(2):321-341.
28. Neher JJ, Emmrich JV, Fricker M, Mander PK, Théry C, Brown GC. Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(43):E4098-107.
29. Goldmann T, Wieghofer P, Jordão MJ, Prutek F, Hagemeyer N, Frenzel K, i sur. Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nature Immunology*. 2016;17(7):797-805.
30. Rajan WD, Wojtas B, Gielniewski B, Miró-Mur F, Pedragosa J, Zawadzka M, i sur. Defining molecular identity and fates of CNS-border associated macrophages after ischemic stroke in rodents and humans. *Neurobiology of Disease*. 2020;137:104722.
31. Kösel S, Egensperger R, Bise K, Arbogast S, Mehraein P, Graeber MB. Long-lasting perivascular accumulation of major histocompatibility complex class II-positive lipophages in the spinal cord of stroke patients: possible relevance for the immune privilege of the brain. *Acta Neuropathologica*. 1997;94(6):532-538.
32. Pedragosa J, Salas-Perdomo A, Gallizioli M, Cugota R, Miró-Mur F, Briansó F, i sur. CNS-border associated macrophages respond to acute ischemic stroke attracting granulocytes and promoting vascular leakage. *Acta Neuropathologica Communications*. 2018;6(1):76.
33. Dagonnier M, Donnan GA, Davis SM, Dewey HM, Howells DW. Acute Stroke Biomarkers: Are We There Yet? *Frontiers in Neurology*. 2021;12:619-21.
34. Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, Pardo AC, i sur. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2008;28(3):468-481.
35. Shen XY, Gao ZK, Han Y, Yuan M, Guo YS, Bi X. Activation and Role of Astrocytes in Ischemic Stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2021;15:755955.
36. Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, i sur. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017;541(7638):481-487.
37. Wang XF, Cynader MS. Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. *Journal of Neurochemistry*. 2000;74(4):1434-1442.

38. Zhao H, Wang R, Wu X, Liang J, Qi Z, Liu X i sur. Erythropoietin delivered via intra-arterial infusion reduces endoplasmic reticulum stress in brain microvessels of rats following cerebral ischemia and reperfusion. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2015;10(1): 153-161.
39. Tanaka K, Nogawa S, Ito D, Suzuki S, Dembo T, Kosakai A, i sur. Activation of NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells during post-ischemic reperfusion in the rat brain. *Neuroreport.* 2001;12(10):2169-2174.
40. Strbian D, Kovanen PT, Karjalainen-Lindsberg ML, Tatlisumak T, Lindsberg PJ. An emerging role of mast cells in cerebral ischemia and hemorrhage. *Ann Med.* 2009;41(6): 438-450.
41. Ferrarese C, Mascarucci P, Zoia C, Cavarretta R, Frigo M, Begni B, i sur. Increased cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 1999;19(9):1004-1009.
42. Anrather J, Iadecola C. Inflammation and Stroke: An Overview. *Neurotherapeutics.* 2016;13(4):661-670.
43. Cuartero MI, Ballesteros I, Moraga A, Nombela F, Vivancos J, Hamilton JA, i sur. N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke: modulation by the PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone. *Stroke.* 2013;44(12):3498-3508.
44. Liu F, Cheng X, Zhong S, Liu C, Jolkkonen J, Zhang X, i sur. Communications Between Peripheral and the Brain-Resident Immune System in Neuronal Regeneration After Stroke. *Frontiers in Immunology.* 2020;11:1931.
45. Raposo C, Graubardt N, Cohen M, Eitan C, London A, Berkutzki T, i sur. CNS repair requires both effector and regulatory T cells with distinct temporal and spatial profiles. *The Journal of Neuroscience.* 2014;34(31):10141-10155.
46. Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C, Velden J, Arunachalam P, Steinbach K, i sur. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood.* 2012;120(18):3793-3802.
47. Gan Y, Liu Q, Wu W, Yin JX, Bai XF, Shen R, i sur. Ischemic neurons recruit natural killer cells that accelerate brain infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2014;111(7):2704-2709.
48. Liesz A, Zhou W, Na SY, Hämmerling GJ, Garbi N, Karcher S, i sur. Boosting regulatory T cells limits neuroinflammation in permanent cortical stroke. *The Journal of Neuroscience.* 2013;33(44):17350-17362.
49. Offner H, Hurn PD. A novel hypothesis: regulatory B lymphocytes shape outcome from experimental stroke. *Translational Stroke Research.* 2012;3(3):324-330.

50. Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annual Review of Biochemistry*. 1990;59:783-836.
51. Offner H, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Vandenbark AA, Hurn PD. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2006;26(5):654-665.
52. Nayak AR, Kashyap RS, Kabra D, Purohit HJ, Taori GM, Dagainawala HF. Time course of inflammatory cytokines in acute ischemic stroke patients and their relation to inter-alpha trypsin inhibitor heavy chain 4 and outcome. *Annals of Indian Academy of Neurology*. 2012;15(3):181-185.
53. Mazzotta G, Sarchielli P, Caso V, Paciaroni M, Floridi A, Floridi A, et al. Different cytokine levels in thrombolysis patients as predictors for clinical outcome. *European Journal of Neurology*. 2004;11(6):377-381.
54. Liao Z, Xiao HT, Zhang Y, Tong RS, Zhang LJ, Bian Y, et al. IL-1 $\beta$ : a key modulator in asthmatic airway smooth muscle hyper-reactivity. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2015;9(4):429-436.
55. del Zoppo GJ. Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2009;158(3):972-982.
56. Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke*. 1995;26(4):676-680.
57. Rothwell N. Interleukin-1 and neuronal injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential. *Brain, Behavior and Immunology*. 2003;17(3):152-157.
58. Suzuki S, Tanaka K, Suzuki N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2009;29(3):464-479.
59. Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1998;18(2):176-179.
60. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annual Review of Immunology*. 2014;32:513-545.
61. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today*. 1996;17(3):138-146.
62. Dimitrijevic OB, Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV. Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Stroke*. 2007;38(4):1345-1353.

63. Wattananit S, Tornero D, Graubardt N, Memanishvili T, Monni E, Tatarishvili J, i sur. Monocyte-Derived Macrophages Contribute to Spontaneous Long-Term Functional Recovery after Stroke in Mice. *The Journal of Neuroscience*. 2016;36(15):4182-4195.
64. O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4<sup>+</sup> Tregs: limiting collateral damage. *The Journal of Clinical Investigation*. 2004; 114(10):1372-1378.
65. Piepke M, Clausen BH, Ludewig P, Vieniues JH, Bedke T, Javidi E, i sur. Interleukin-10 improves stroke outcome by controlling the detrimental Interleukin-17A response. *Journal of Neuroinflammation*. 2021;18(1):265.
66. Nair MG, Guild KJ, Artis D. Novel effector molecules in type 2 inflammation: lessons drawn from helminth infection and allergy. *Journal of Immunology*. 2006;177(3):1393-1399.
67. Lin J, Kakkar V, Lu X. Essential Roles of Toll-Like Receptors in Atherosclerosis. *Current Medical Chemistry*. 2016;23(5):431-454.
68. Lua J, Ekanayake K, Fangman M, Doré S. Potential Role of Soluble Toll-like Receptors 2 and 4 as Therapeutic Agents in Stroke and Brain Hemorrhage. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(18):9977.
69. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*. 2010;11(5):373-384.
70. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*. 2010;32(3):305-315.
71. Langjahr P, Díaz-Jiménez D, De la Fuente M, Rubio E, Golenbock D, Bronfman FC, i sur. Metalloproteinase-dependent TLR2 ectodomain shedding is involved in soluble toll-like receptor 2 (sTLR2) production. *PLoS One*. 2014;9(12):e104624.
72. Iwami KI, Matsuguchi T, Masuda A, Kikuchi T, Musikacharoen T, Yoshikai Y. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *Journal of Immunology*. 2000;165(12):6682-6686.
73. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental neurology*. 2002;61(11):1013-1021.
74. Hanke ML, Kielian T. Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science*. 2011;121(9):367-387.
75. Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure*. 2011;19(4):447-459.
76. Bella J, Hindle KL, McEwan PA, Lovell SC. The leucine-rich repeat structures. *Cellular and Molecular Life Science*. 2008;65(15):2307-2333.



77. Nyman T, Stenmark P, Flodin S, Johansson I, Hammarström M, Nordlund P. The crystal structure of the human toll-like receptor 10 cytoplasmic domain reveals a putative signaling dimer. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(18):11861-11865.
78. Gesuete R, Kohama SG, Stenzel-Poore MP. Toll-like receptors and ischemic brain injury. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2014;73(5):378-386.
79. Ziegler G, Harhausen D, Schepers C, Hoffmann O, Röhr C, Prinz V, i sur. TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;3(359):574-579.
80. Boháček I, Cordeau P, Lalancette-Hébert M, Gorup D, Weng YC, Gajović S, i sur. Toll-like receptor 2 deficiency leads to delayed exacerbation of ischemic injury. *Journal of Neuroinflammation*. 2012;9:191.
81. Lalancette-Hébert M, Phaneuf D, Soucy G, Weng YC, Kriz J. Live imaging of Toll-like receptor 2 response in cerebral ischaemia reveals a role of olfactory bulb microglia as modulators of inflammation. *Brain*. 2009;134(4):940-954.
82. Winters L, Winters T, Gorup D, Mitrečić D, Curlin M, Križ J, i sur. Expression analysis of genes involved in TLR2-related signaling pathway: Inflammation and apoptosis after ischemic brain injury. *Neuroscience*. 2013;238:87-96.
83. Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, i sur. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nature Medicine*. 2012;18(6):911-917.
84. Ziegler G, Freyer D, Harhausen D, Khojasteh U, Nietfeld W, Trendelenburg G. Blocking TLR2 in vivo protects against accumulation of inflammatory cells and neuronal injury in experimental stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2011;31(2):757-766.
85. Lehnardt S, Lehmann S, Kaul D, Tschimmel K, Hoffmann O, Cho S, i sur. Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia. *Journal of Neuroimmunology*. 2007;190(1-2):28-33.
86. Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, i sur. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(34):13798-13803.
87. Hua F, Ma J, Ha T, Kelley JL, Kao RL, Schweitzer JB, i sur. Differential roles of TLR2 and TLR4 in acute focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Brain Research*. 2009;1262:100-108.
88. Gorup D, Škokić S, Kriz J, Gajović S. Tlr2 Deficiency is Associated with Enhanced Elements of Neuronal Repair and Caspase 3 Activation Following Brain Ischemia. *Scientific Reports*. 2019;9(1):2821.

89. Lu C, Liu L, Chen Y, Ha T, Kelley J, Schweitzer J, i sur. TLR2 ligand induces protection against cerebral ischemia/reperfusion injury via activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling. *Journal of Immunology*. 2011;187(3):1458-1466.
90. Abe T, Shimamura M, Jackman K, Kurinami H, Anrather J, Zhou, i sur. Key role of CD36 in Toll-like receptor 2 signaling in cerebral ischemia. *Stroke*. 2010;41(5):898-904.
91. Ling Y, Jin L, Ma Q, Huang Y, Yang Q, Chen M, i sur. Salvianolic acid A alleviated inflammatory response mediated by microglia through inhibiting the activation of TLR2/4 in acute cerebral ischemia-reperfusion. *Phytomedicine*. 2021;87:153569.
92. Chen KH, Lin KC, Ko SF, Chiang JY, Guo J, Yip HK. Melatonin against acute ischaemic stroke dependently via suppressing both inflammatory and oxidative stress downstream signalling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020;24(18):10402-10419.
93. Fan H, Li L, Zhang X, Liu Y, Yang C, Yang Y, i sur. Oxymatrine downregulates TLR4, TLR2, MyD88, and NF-kappaB and protects rat brains against focal ischemia. *Mediators of Inflammation*. 2009;2009:704706.
94. Gao W, Xiong Y, Li Q, Yang H. Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases: A Journey from Molecular to Nano Therapeutics. *Frontiers in Physiology*. 2017;8:508.
95. Reilly M, Miller RM, Thomson MH, Patris V, Ryle P, McLoughlin L, i sur. Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating phase I, healthy subjects study of intravenous OPN-305, a humanized anti-TLR2 antibody. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2013;94(5):593-600.
96. Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Design, Development and Therapy*. 2015;2:3445-3454.
97. Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, i sur. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke*. 2009;40(6):2244-2250.
98. Howells DW, Porritt MJ, Rewell SS, O'Collins V, Sena ES, van der Worp HB, i sur. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010;30(8):1412-1431.
99. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in which recirculation can introduced into the ischemic area. *Japanese Journal of Stroke*. 1986;8(1):1-8.
100. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20(1):84-91.

101. McColl BW, Carswell HV, McCulloch J, Horsburgh K. Extension of cerebral hypoperfusion and ischaemic pathology beyond MCA territory after intraluminal filament occlusion in C57Bl/6J mice. *Brain Research*. 2004;997(1):15-23.
102. Türeyen K, Vemuganti R, Sailor KA, Dempsey RJ. Ideal suture diameter is critical for consistent middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurosurgery*. 2005;56(1):196-200.
103. Yang G, Kitagawa K, Matsushita K, Mabuchi T, Yagita Y, Yanagihara T, i sur. C57BL/6 strain is most susceptible to cerebral ischemia following bilateral common carotid occlusion among seven mouse strains: selective neuronal death in the murine transient forebrain ischemia. *Brain Research*. 1997;752(1-2):209-218.
104. Hossmann KA. The two pathophysiologies of focal brain ischemia: implications for translational stroke research. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2012; 32(7):1310-1316.
105. Dirnagl U. *Rodent Models of Stroke*. 2nd ed.: Springer Protocols; 2016.
106. Patterson AP, Booth SA, Saba R. The emerging use of in vivo optical imaging in the study of neurodegenerative diseases. *BioMed Research International*. 2014;2014: 401306.
107. Roberts TP, Mikulis D. *Neuro MR: principles*. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2007;26(4):823-837.
108. Røhl L, Ostergaard L, Simonsen CZ, Vestergaard-Poulsen P, Andersen G, Sakoh M, i sur. Viability thresholds of ischemic penumbra of hyperacute stroke defined by perfusion-weighted MRI and apparent diffusion coefficient. *Stroke*. 2001;32(5):1140-1146.
109. Reese T, Bochelen D, Sauter A, Beckmann N, Rudin M. Magnetic resonance angiography of the rat cerebrovascular system without the use of contrast agents. *NMR in Biomedicine*. 1999;12(4):189-196.
110. Dijkhuizen RM, Nicolay K. Magnetic resonance imaging in experimental models of brain disorders. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2003;23(12):1383-1402.
111. Granziera C, D'Arceuil H, Zai L, Magistretti PJ, Sorensen AG, de Crespigny AJ. Long-term monitoring of post-stroke plasticity after transient cerebral ischemia in mice using in vivo and ex vivo diffusion tensor MRI. *The Open Neuroimaging Journal*. 2007;1:10-17.
112. Kim YR, Huang IJ, Lee SR, Tejima E, Mandeville JB, van Meer MP, i sur. Measurements of BOLD/CBV ratio show altered fMRI hemodynamics during stroke recovery in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2005;25(7):820-829.
113. Yang GY, Betz AL. Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 1994;25(8):1658-1664.

114. Stoll G, Bendszus M. Imaging of inflammation in the peripheral and central nervous system by magnetic resonance imaging. *Neuroscience*. 2009;158(3):1151-1160.
115. Kaskova ZM, Tsarkova AS, Yampolsky IV. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. *Chemical Society Reviews*. 2016;45(21):6048-6077.
116. East AK, Lucero MY, Chan J. New directions of activity-based sensing for in vivo NIR imaging. *Chemical Science*. 2020;12(10):3393-3405.
117. Zhao H, Doyle TC, Coquoz O, Kalish F, Rice BW, Contag CH. Emission spectra of bioluminescent reporters and interaction with mammalian tissue determine the sensitivity of detection in vivo. *Journal of Biomedical Optics*. 2005;10(4):41210.
118. Luker KE, Luker GD. Bioluminescence imaging of reporter mice for studies of infection and inflammation. *Antiviral Research*. 2010;86(1):93-100.
119. Collmann FM, Pijnenburg R, Hamzei-Taj S, Minassian A, Folz-Donahue K, Kukat C, i sur. Individual in vivo Profiles of Microglia Polarization After Stroke, Represented by the Genes iNOS and Ym1. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:1236.
120. Selt M, Tennstaedt A, Beyrau A, Nelles M, Schneider G, Löwik C, i sur. In Vivo Non-Invasive Tracking of Macrophage Recruitment to Experimental Stroke. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156626.
121. Cordeau P Jr, Lalancette-Hébert M, Weng YC, Kriz J. Live imaging of neuroinflammation reveals sex and estrogen effects on astrocyte response to ischemic injury. *Stroke*. 2008;39(3):935-942.
122. Quattromani MJ, Cordeau P, Ruscher K, Kriz J, Wieloch T. Enriched housing down-regulates the Toll-like receptor 2 response in the mouse brain after experimental stroke. *Neurobiology of Disorders*. 2014;66:66-73.
123. Lalancette-Hébert M, Julien C, Cordeau P, Boháček I, Weng YC, Calon F, i sur. Accumulation of dietary docosahexaenoic acid in the brain attenuates acute immune response and development of postischemic neuronal damage. *Stroke*. 2011;42(10):2903-2909.
124. Gorup D, Boháček I, Miličević T, Pochet R, Mitrečić D, Križ J, i sur. Increased expression and colocalization of GAP43 and CASP3 after brain ischemic lesion in mouse. *Neuroscience Letters*. 2015;597:176-182.
125. Adamczak JM, Schneider G, Nelles M, Que I, Suidgeest E, van der Weerd L, i sur. In vivo bioluminescence imaging of vascular remodeling after stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014;8:274.

126. Aswendt M, Adamczak J, Tennstaedt A. A review of novel optical imaging strategies of the stroke pathology and stem cell therapy in stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014;8:226.
127. National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. National Academies Press. 2009.
128. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, i sur. The human genome browser at UCSC. *Genome Research*. 2002;12(6):996-1006.
129. O'Neill MJ, Clemens JA. Rodent models of focal cerebral ischemia. *Current Protocols in Neuroscience*. 2001; Poglavlje 9: Podjedinica 9.6.
130. Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, i sur. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2001; 32(4):1005-1011.
131. Petullo D, Masonic K, Lincoln C, Wibberley L, Teliska M, Yao DL. Model development and behavioral assessment of focal cerebral ischemia in rats. *Life Sciences*. 1999;64(13): 1099-1108.
132. Rorden C., Naveaum M. Bruker ParaVision to NIfTI Conversion Software. [Program na Internetu].; 2018 [Pristupljeno 2020 02 15]. Dostupno na: <https://github.com/neurolabusc/Bru2Nii>.
133. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Kluge A, Bachmann A, i sur. Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. *Stroke*. 2004;32(2):566-571.
134. Lee JK, Tansey MG. Microglia isolation from adult mouse brain. *Methods in Molecular Biology*. 2013;1041:17-23.
135. Srakočić S, Josić P, Trifunović S, Gajović S, Grčević D, Glasnović A. Proposed practical protocol for flow cytometry analysis of microglia from the healthy adult mouse brain: Systematic review and isolation methods' evaluation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2022;16:1017976.
136. Allen Institute for Brain Science. Allen Mouse Brain Atlas [Baza podataka na Internetu].; 2004 [Pristupljeno 2020 03 01]. Dostupno na: [mouse.brain-map.org](http://mouse.brain-map.org).
137. NC3Rs. Guidance for blood sampling: mouse. [Stranica na Internetu].; 2004 [pristupljeno 2019 09 10]. Dostupno na: <https://nc3rs.org.uk/3rs-resources/blood-sampling/blood-sampling-mouse>.
138. BioLegend. LEGENDplex: Mouse inflammation panel (13-plex). [Protokol na Internetu].; 2014 [Pristupljeno 2019 11 05]. Dostupno na:

[https://www.biolegend.com/Files/Images/media\\_assets/pro\\_detail/datasheets/76100\\_Mouse\\_Inflammation\\_Panel\\_V05.pdf](https://www.biolegend.com/Files/Images/media_assets/pro_detail/datasheets/76100_Mouse_Inflammation_Panel_V05.pdf).

139. Martin E, El-Behi M, Fontaine B, Delarasse C. Analysis of Microglia and Monocyte-derived Macrophages from the Central Nervous System by Flow Cytometry. *Journal of Visualized Experiments*. 2017;(124):55781.
140. Wang PL, Yim AKY, Kim KW, Avey D, Czepielewski RS, Colonna M, et al. Peripheral nerve resident macrophages share tissue-specific programming and features of activated microglia. *Nature Communications*. 2020;11(1):2552.
141. Haage V, Semtner M, Vidal RO, Hernandez DP, Pong WW, Chen Z, et al. Comprehensive gene expression meta-analysis identifies signature genes that distinguish microglia from peripheral monocytes/macrophages in health and glioma. *Acta Neuropathologica Communications*. 2019;7(1):20.
142. Greaves DR, Gordon S. Macrophage-specific gene expression: current paradigms and future challenges. *International Journal of Hematology*. 2002;76(1):6-15.
143. Li S, Ruan Z, Zhang H, Xu H. Recent achievements of bioluminescence imaging based on firefly luciferin-luciferase system. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021; 211:113111.
144. Li J, Chen L, Du L, Li M. Cage the firefly luciferin! - a strategy for developing bioluminescent probes. *Chemical Society Reviews*. 2013;42(2):622-676.
145. Martynov MY, Gusev EI. Current knowledge on the neuroprotective and neuroregenerative properties of citicoline in acute ischemic stroke. *Journal of Experimental Pharmacology*. 2015;7:17-28.
146. Furlan JC, Vergouwen MD, Fang J, Silver FL. White blood cell count is an independent predictor of outcomes after acute ischaemic stroke. *European Journal of Neurology*. 2014;21(2):215-222.
147. Min H, Hong J, Cho IH, Jang YH, Lee H, Kim D, et al. TLR2-induced astrocyte MMP9 activation compromises the blood brain barrier and exacerbates intracerebral hemorrhage in animal models. *Molecular Brain*. 2015;8:23.
148. Babcock AA, Wirenfeldt M, Holm T, Nielsen HH, Dissing-Olesen L, Toft-Hansen H, et al. Toll-like receptor 2 signaling in response to brain injury: an innate bridge to neuroinflammation. *The Journal of Neuroscience*. 2006;26(49):12826-12837.
149. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature Medicine*. 2011;17(7):796-808.
150. Jayaraj RL, Azimullah S, Beiram R, Jalal FY, Rosenberg GA. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *Journal of Neuroinflammation*. 2019;16(1):142.

151. Yuan Y, Zha H, Rangarajan P, Ling EA, Wu C. Anti-inflammatory effects of Edaravone and Scutellarin in activated microglia in experimentally induced ischemia injury in rats and in BV-2 microglia. *BMC Neuroscience*. 2014;15:125.
152. Liska GM, Lippert T, Russo E, Nieves N, Borlongan CV. A Dual Role for Hyperbaric Oxygen in Stroke Neuroprotection: Preconditioning of the Brain and Stem Cells. *Conditioning Medicine*. 2018;1(4):151-166.
153. Kurushima H, Ramprasad M, Kondratenko N, Foster DM, Quehenberger O, Steinberg D. Surface expression and rapid internalization of macrosialin (mouse CD68) on elicited mouse peritoneal macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000;67(1):104-108.
154. Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2006;26(8):1702-1711.
155. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2020;14:198.
156. Jiang CT, Wu WF, Deng YH, Ge JW. Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2020;21(5):2006-2018.
157. Hou D, Wang C, Ye X, Zhong P, Wu D. Persistent inflammation worsens short-term outcomes in massive stroke patients. *BMC Neurology*. 2021;21(1):62.
158. Zhang XG, Xue J, Yang WH, Xu XS, Sun HX, Hu L, et al. Inflammatory markers as independent predictors for stroke outcomes. *Brain and Behavior*. 2021;11(1):e01922.
159. Liberale L, Bonetti NR, Puspitasari YM, Schwarz L, Akhmedov A, Montecucco F, et al. Postischemic Administration of IL-1 $\alpha$  Neutralizing Antibody Reduces Brain Damage and Neurological Deficit in Experimental Stroke. *Circulation*. 2020;142(2):187-189.
160. Waisman A, Hauptmann J, Regen T. The role of IL-17 in CNS diseases. *Acta Neuropathologica*. 2015;129(5):625-637.
161. Gelderblom M, Gallizioli M, Ludewig P, Thom V, Arunachalam P, Rissiek B. IL-23 (Interleukin-23)-Producing Conventional Dendritic Cells Control the Detrimental IL-17 (Interleukin-17) Response in Stroke. *Stroke*. 2018;49(1):155-164.
162. Carl JW, Bai XF. IL27: its roles in the induction and inhibition of inflammation. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2008;1(2):117-123.
163. Luo C, Li B, Chen L, Zhao L, Wei Y. IL-27 Protects the Brain from Ischemia-Reperfusion Injury via the gp130/STAT3 Signaling Pathway. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2021;71(9):1838-1848.

164. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011;1813(5): 878-888.
165. Lee AJ, Ashkar AA. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:2061.
166. Inácio AR, Liu Y, Clausen BH, Svensson M, Kucharz K, Yang Y, i sur. Endogenous IFN- $\beta$  signaling exerts anti-inflammatory actions in experimentally induced focal cerebral ischemia. *Journal of Neuroinflammation*. 2015;12:211.
167. Rahman MT, Ghosh C, Hossain M, Linfield D, Rezaee F, Janigro D, i sur. IFN- $\gamma$ , IL-17A, or zonulin rapidly increase the permeability of the blood-brain and small intestinal epithelial barriers: Relevance for neuro-inflammatory diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;507(1-4):274-279.
168. Egea L, Hirata Y, Kagnoff MF. GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 2010;4(6):723-731.
169. Lanfranconi S, Locatelli F, Corti S, Candelise L, Comi GP, Baron PL, i sur. Growth factors in ischemic stroke. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2011;15(8): 1645-1687.
170. Sternak M, Glasnović A, Josić P, Romić D, Gajović S. The effects of splenectomy in murine models of ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neuroinflammation*. 2022;19(1):233.
171. Skukan L, Brezak M, Ister R, Klimaschewski L, Vojta A, Zoldoš V, i sur. Lentivirus- or AAV-mediated gene therapy interventions in ischemic stroke: A systematic review of preclinical in vivo studies. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2022;42(2): 219-236.
172. Prescott MJ, Lidster K. Improving quality of science through better animal welfare: the NC3Rs strategy. *Lab Animal*. 2017;46(4):152-156.
173. Liu F, McCullough LD. Middle cerebral artery occlusion model in rodents: methods and potential pitfalls. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011;2011:464701.



## 11. ŽIVOTOPIS

Sanja Srakočić, mag. biol. mol. rođena je 1. 9. 1994. u Zagrebu. Završila je opću gimnaziju u Karlovcu. Upisala je preddiplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu 2013. godine, gdje je 2016. godine upisala diplomski studij Molekularne biologije. Nakon što je diplomirala, u srpnju 2019. godine zapošljava se kao asistent na Katedri za Histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu te kao znanstveni suradnik na projektu RepairStroke kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost. Također, 2019. godine upisuje poslijediplomski studij Neuroznanosti na Medicinskom fakultetu u Zagrebu te izrađuje doktorsku disertaciju pod vodstvom prof. dr. sc. Srećka Gajovića. Stekla je internacionalnu dozvolu za rad s laboratorijskim životinjama (LabAnim B kategorija, dozvola broj 247.3-29 HR 191/02/P) te potvrdu o osposobljenost za rad na pretkliničkom MRI sustavu. Bila je ko-mentor na studentskom radu koji je osvojio Rektorovu nagradu. Tijekom poslijediplomskog studija bila je prvi autor na dva znanstvena članka iz područja disertacije objavljena u Q1 časopisima. Sudjelovala je na tri međunarodne škole te je svoje istraživanje prezentirala na 10 međunarodnih i domaćih kongresa.